

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**



**Infección Seminal e Intraespermática  
por Chlamydia Trachomatis en Hombres  
Subfértiles, Comprobación por  
Inmunofluorescencia Directa en Cortes  
Semifinos del Centrifugado Seminal**

**TESIS DOCTORAL**

**Alberto Niderhauser García**

**Directores:**

**María Guadalupe Gallegos Ávila**

**José Javier Sánchez Hernández**

**Jesús Áncer Rodríguez**

**Madrid, 2012**



**UANL**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

**MARÍA GUADALUPE GALLEGOS ÁVILA**

PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

CERTIFICA Que: Don **ALBERTO NIDERHAUSER GARCIA**,  
Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de  
investigación titulado: **“Infección seminal e intraespermática por  
Chlamydia trachomatis en hombres subfértiles, Comprobación por  
Inmunofluorescencia directa en cortes semifinos del centrifugado  
seminal.”**El cual considero completamente satisfactorio para ser presentado  
y defendido como Tesis para la obtención del grado de Doctor en la  
Universidad Autónoma de Madrid.

ATENTAMENTE

Monterrey, N.L., a 3 de octubre de 2011

Fdo.: MARIA GUADALUPE GALLEGOS ÁVILA



Av. Francisco I Madero y Dr. Aguirre Pequeño, S.N.  
Colonia Mitras Centro C.P. 64460  
Monterrey, N.L. México, Tel. (52) 81-83294183  
patologia@fm.uanl.mx



D. José Javier Sánchez Hernández Profesor Titular de Universidad del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICA QUE:

El trabajo titulado "INFECCIÓN SEMINAL E INTRAESPERMÁTICA POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS EN HOMBRES SUBFÉRTILES. COMPROBACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA EN CORTES SEMIFINOS DEL CENTRIFUGADO SEMINAL", presentado por el Dº. Alberto Niderhauser Garcia, ha sido realizado bajo mi dirección y considero que reúne las condiciones de originalidad y metodológicas para ser leído y defendido como TESIS DOCTORAL para optar el título de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para conste a efectos académicos, firmo el presente CERTIFICADO en Madrid, a 16 de noviembre de dos mil once.

Fdo.: Profesor José Javier Sánchez Hernández



UANL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

**DR. JESÚS ANCER RODRIGUEZ**

PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

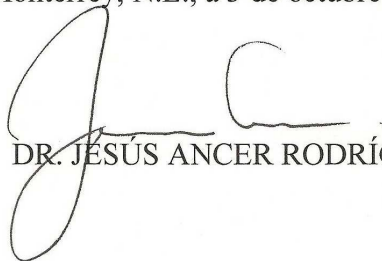
FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

CERTIFICA QUE: DON **ALBERTO NIDERHAUSER GARCIA**,  
Licenciado en Medicina, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de  
investigación titulado: **“Infección seminal e intraespermática por  
*Chlamydia trachomatis* en hombres subfértiles, Comprobación por  
Inmunofluorescencia directa en cortes semifinos del centrifugado  
seminal.”**El cual considero completamente satisfactorio para ser presentado  
y defendido como Tesis para la obtención del grado de Doctor en la  
Universidad Autónoma de Madrid.

ATENTAMENTE

Monterrey, N.L., a 3 de octubre de 2011



DR. JESÚS ANCER RODRÍGUEZ



Av. Francisco I Madero y Dr. Aguirre Pequeño, S.N.  
Colonia Mitras Centro C.P. 64460  
Monterrey, N.L. México, Tel. (52) 81-83294183  
patologia@fm.uanl.mx



## ***Agradecimientos:***

*A la **Dra. Med. María Guadalupe Gallegos Ávila**, por sus valiosas aportaciones científicas, consejos y opiniones, por sus buenos sentimientos hacia mi persona, pero aun más por creer en mi e impulsarme en forma tenaz y constante en el inicio, desarrollo y conclusión de esta tesis.*

*Al **Dr. Med. Jesús Áncer Rodríguez**, por la sincera e inapreciable amistad que nos une, por el decisivo apoyo para la realización de este proyecto académico y por darnos un ejemplo de trabajo y entrega al quehacer universitario.*

*Al **Dr. José Javier Sánchez Hernández**, por su amable y desinteresada asesoría en el análisis estadístico, así como en la lectura y crítica de esta tesis, pero ante todo por distinguirme con su amistad.*

*Al **Dr. Carlos Gamallo Amat**, Catedrático de Anatomía Patológica de la Universidad Autónoma de Madrid, por su experta asesoría, la lectura crítica y observaciones de carácter científico, que enriquecieron en forma importante este trabajo.*

*Al **Dr. David Hardisson**,  
al **Dr. Manuel Nistal de Serrano**,  
y, particularmente, al **Dr. Javier Regadera González**,  
por crear, promover y acrecentar los vínculos de colaboración académica entre  
nuestras Universidades, que ha sido de gran beneficio personal e institucional.*

*A todos mis **Amigos, Colaboradores y Compañeros**,  
del Departamento de Patología de la Facultad Autónoma de Nuevo León  
y, muy en especial, al **Q.C.B. Benito Ramos González**,  
a la **Dra. Ivett C. Miranda Maldonado**,  
a la **Dra. Adriana G. Áncer Arellano** y  
a la **Dra. Ma. de Lourdes Chávez Briones**,  
quienes contribuyeron en forma importantísima con su constante, leal e invaluable  
esfuerzo académico y apoyo laboral para la realización de este documento.*

## ***Dedicatoria:***

*A mi amada esposa **Sandra Patricia**, que me ha acompañado y apoyado en todo momento y en la realización de todos nuestros proyectos, entre ellos, el de realizar y concluir esta Tesis.*

*A mis hijos, **Juan Alberto y Sara Angelina**, por ser la luz de mi vida y los motores que me impulsaron a conseguir esta meta de superación profesional.*

*y*

*A mi madre, **Angelina**, in memoriam, porque, a parte de la vida, le debo mi formación personal y profesional, **que es la mejor de las herencias**, y de quien, junto con mi hijo **Amel de Jesús**, guardo alegres e imborrables recuerdos.*

## INDICE

|   |     |
|---|-----|
| Lista de figuras.....   | i   |
| Lista de tablas.....  | vi  |
| Abreviaturas.....   | vii |
| <b>1. INTRODUCCION.....</b>   |     |
| 1.1 PATOLOGÍA INFLAMATORIA DEL TRACTO GENITAL MASCULINO ASOCIADA A <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>         | 1   |
| 1.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN UROGENITAL POR <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>                           | 3   |
| 1.3 INFECCIONES CRÓNICAS POR <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> , SECUELAS CICATRICIALES Y SUS COMPLICACIONES | 5   |
| 1.4 ASOCIACION DE INFECCIÓN E INFLAMACIÓN CRÓNICA CON LA ETIOLOGÍA DEL CÁNCER.                          | 7   |
| 1.5 PERSPECTIVA HISTÓRICA DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>   | 8   |
| 1.6 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y TAXONOMÍA DE LAS CLAMIDIAS   | 11  |
| 1.7 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>CHLAMYDIA SP.</i>  | 15  |
| 1.8 SUB-FERTILIDAD DEL VARÓN E INFECCIÓN GENITO-URINARIA POR <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>               | 16  |
| 1.9 ALTERACIONES SEMINOLÓGICAS POR <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>   | 17  |
| 1.10 MECANISMOS DEL DAÑO A LOS ESPERMATOZOIDES EN PACIENTES CON INFECCIONES GENITO-URINARIAS            | 20  |
| 1.11 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE <i>CHLAMYDIA</i>   | 23  |
| 1.11.1 Cultivo en Líneas Celulares  | 24  |
| 1.11.2 Detección Directa del Antígeno   | 24  |
| 1.11.3 Enzimoinmunoanálisis   | 27  |
| 1.11.4 Fijación del Complemento   | 28  |
| 1.11.5 Hibridación con Sondas de DNA  | 29  |
| 1.11.6 Amplificación de Ácidos Nucleicos  | 29  |
| 1.11.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR  | 30  |
| 1.12 ESTUDIOS CITOMORFOLÓGICOS EN INFECCIONES GENITALES POR <i>CHLAMYDIA</i> .                          | 31  |
| <b>2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>  | 39  |
| <b>3. OBJETIVOS .....</b>   | 40  |
| <b>4. PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>  |     |
| 4.1 PACIENTES   | 41  |
| 4.2 MÉTODOS   | 42  |
| 4.2.1 Determinaciones Microbiológicas   | 42  |
| 4.2.1.1 Prueba de Inmunofluorescencia Directa con Anticuerpos Anti-Chlamydia                            | 42  |
| 4.2.1.2 Cultivo para la Identificación de <i>Mycoplasma sp.</i> y <i>Ureaplasma sp.</i>                 | 43  |
| 4.2.1.3 Cultivos Generales  | 44  |
| 4.2.2 Estudio Citomorfológico en Corte Semifino   | 44  |
| 4.2.3 Análisis Estadístico  | 46  |
| 4.2.3.1 Tamaño Muestral   | 46  |
| 4.2.3.2 Estadística Descriptiva   | 46  |

---

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 4.2.3.3   | Inferencia Estadística                                 | 47 |
| 4.2.3.4   | Selección Aleatoria                                    | 47 |
| 4.2.3.5   | Evaluación de las Muestras                             | 47 |
| <b>5.</b> | <b>RESULTADOS .....</b>                                |    |
| 5.1       | DATOS CLÍNICOS   | 48 |
| 5.1.1     | Grupos de Estudio                                      | 49 |
| 5.1.2     | Antecedentes Clínicos del Hombre                       | 49 |
| 5.1.2.1   | Edad   | 49 |
| 5.1.2.2   | Tipo y Tiempo de Infertilidad                          | 50 |
| 5.1.2.3   | Antecedentes de Infección Genitourinaria               | 51 |
| 5.1.2.4   | Antecedentes de Alteraciones Seminales                 | 51 |
| 5.1.2.5   | Antecedentes de Diagnóstico Microbiológico             | 52 |
| 5.1.2.6   | Presencia de Varicocele                                | 52 |
| 5.1.3     | Antecedentes clínicos de la mujer                      | 53 |
| 5.1.3.1   | Infección Genitourinaria                               | 53 |
| 5.1.3.2   | Tratamientos Previos para Infección Genitourinaria     | 53 |
| 5.1.3.3   | Antecedente de Pérdidas Gestacionales                  | 54 |
| 5.1.3.4   | Diagnóstico Microbiológico de Infección Genitourinaria | 54 |
| 5.1.3.5   | Tratamientos Previos para Fertilidad                   | 55 |
| 5.2       | RESULTADOS DEL SEMINOGRAMA                             | 57 |
| 5.2.1     | Aspectos Físico-Químicos                               | 57 |
| 5.2.1.1   | Volumen del Líquido Seminal                            | 57 |
| 5.2.1.2   | Color del Líquido Seminal                              | 58 |
| 5.2.1.3   | Viscosidad   | 59 |
| 5.2.1.4   | pH del Líquido Seminal                                 | 60 |
| 5.2.2     | Concentración Espermática                              | 60 |
| 5.2.3     | Vitalidad Espermática                                  | 61 |
| 5.2.4     | Viabilidad Espermática                                 | 62 |
| 5.2.5     | Patrón de Motilidad Espermática                        | 63 |
| 5.2.5.1   | Movimiento Progresivo Total en Fresco                  | 63 |
| 5.2.5.2   | Movimiento Progresivo Rectilíneo en Fresco             | 64 |
| 5.2.5.3   | Movimiento Progresivo Total a la Hora                  | 65 |
| 5.2.5.4   | Movimiento Progresivo Rectilíneo a la Hora             | 65 |
| 5.2.5.5   | Movimiento Progresivo Total a las Dos Horas            | 66 |
| 5.2.5.6   | Movimiento Progresivo Rectilíneo a las Dos Horas       | 66 |
| 5.2.6     | Morfología Espermática                                 | 66 |
| 5.2.6.1   | Patrón de Alteraciones Morfológicas                    | 67 |
| 5.2.6.2   | Alteraciones Nucleares                                 | 67 |
| 5.2.6.3   | Alteraciones del Acrosoma                              | 68 |
| 5.2.6.4   | Alteraciones de la Pieza Media del Flagelo             | 68 |
| 5.2.6.5   | Alteraciones de la Pieza Principal                     | 69 |
| 5.2.7     | Cambios Citológicos de Tipo Inflamatorio               | 74 |
| 5.2.7.1   | Presencia de Detritus Celulares                        | 74 |
| 5.2.7.2   | Presencia de Células Epiteliales                       | 74 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| 5.2.7.3    | Presencia de Bacterias   | 74  |
| 5.2.7.4    | Presencia de Leucocitos  | 74  |
| 5.2.7.5    | Presencia de Fagocitos   | 75  |
| 5.3        | RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL CORTE SEMIFINO CON AZUL DE TOLUIDINA E IFD CONTRA CHLAMYDIA TRACHOMATIS | 77  |
| 5.3.1      | Datos de Inflamación   | 77  |
| 5.3.1.1    | Presencia de Leucocitos  | 77  |
| 5.3.1.1.1  | Leucocitos con Inclusiones Bacterianas   | 79  |
| 5.3.1.1.2  | Leucocitos con Fagocitosis Inespecífica  | 79  |
| 5.3.1.1.3  | Leucocitos con Fagocitosis de Espermatozoides  | 80  |
| 5.3.1.2    | Presencia de Fagocitos   | 81  |
| 5.3.1.2.1  | Fagocitos Activos  | 82  |
| 5.3.1.2.2  | Fagocitos con Inclusiones Bacterianas  | 83  |
| 5.3.1.2.3  | Macrófagos con Fagocitosis Inespecífica  | 84  |
| 5.3.1.2.4  | Macrófagos con Fagocitosis de Espermatozoides  | 85  |
| 5.3.1.2.5  | Macrófagos con Bacterias Adheridas   | 86  |
| 5.3.1.2.6  | Espermiófagos Gigantes   | 88  |
| 5.3.1.3    | Presencia de Células Epiteliales   | 89  |
| 5.3.1.3.1  | Células Epiteliales Con Inclusiones Bacterianas  | 90  |
| 5.3.1.3.2  | Células Epiteliales Con Bacterias Adheridas  | 90  |
| 5.3.1.3.3  | Células Epiteliales en Autólisis   | 91  |
| 5.3.1.4    | Presencia de Restos Citoplásmicos  | 92  |
| 5.3.1.4.1  | Restos Citoplásmicos Con Bacterias   | 93  |
| 5.3.1.5    | Presencia de Detritus Celulares  | 94  |
| 5.3.1.6    | Presencia de Filamentos Irregulares  | 95  |
| 5.3.1.7    | Presencia de Cuerpos Amiláceos de la Próstata  | 96  |
| 5.3.2      | Presencia de Bacterias   | 101 |
| 5.3.2.1    | Cocos  | 101 |
| 5.3.2.2    | Bacterias Pleomórficas   | 105 |
| 5.3.2.2.1  | Concentración  | 105 |
| 5.3.2.2.2  | Adheridas a Restos Citoplásmicos   | 106 |
| 5.3.2.2.3  | En el Interior de los Restos Citoplásmicos   | 107 |
| 5.3.2.2.4  | Adheridas a Células Epiteliales  | 108 |
| 5.3.2.2.5  | En el Citoplasma de Células Epiteliales  | 108 |
| 5.3.2.2.6  | Adheridas y en el Citoplasma de Leucocitos   | 109 |
| 5.3.2.2.7  | Adheridas y en el Citoplasma de Macrófagos   | 109 |
| 5.3.2.2.8  | En el área de Detritus   | 109 |
| 5.3.2.2.9  | Adheridas a Espermatozoides  | 109 |
| 5.3.2.2.10 | Dentro de los Espermatozoides  | 110 |
| 5.3.2.2.11 | Adheridas y en el Citoplasma de Células Espermatogénicas   | 112 |
| 5.3.2.2.12 | Análisis Estadístico de las Bacterias Pleomórficas por Diagnóstico Microbiológico                  | 112 |
| 5.3.2.3    | Cuerpos Elementales de Chlamydia Trachomatis   | 113 |
| 5.3.2.3.1  | Concentración  | 113 |
| 5.3.2.3.2  | Adheridos a Restos Celulares   | 115 |



|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 5.3.2.3.3  | En el Interior de Restos Celulares   | 115        |
| 5.3.2.3.4  | Adheridos a Células Epiteliales  | 116        |
| 5.3.2.3.5  | En el Citoplasma de Células Epiteliales  | 117        |
| 5.3.2.3.6  | Adheridos y en el Citoplasma de Leucocitos   | 117        |
| 5.3.2.3.7  | Adheridos a Macrófagos   | 117        |
| 5.3.2.3.8  | En el Citoplasma de Macrófagos   | 118        |
| 5.3.2.3.9  | Asociados a Detritus   | 119        |
| 5.3.2.3.10 | Adheridos a Espermatozoides  | 119        |
| 5.3.2.3.11 | Dentro de Espermatozoides  | 119        |
| 5.3.2.3.12 | Adheridos a Células Espermatogénicas   | 120        |
| 5.3.2.3.13 | En el Citoplasma de Células Espermatogénicas   | 120        |
| 5.3.2.3.14 | Análisis estadístico de los cuerpos elementales por diagnóstico microbiológico                         | 121        |
| 5.3.2.4    | Cuerpos Reticulares de Chlamydia Trachomatis   | 123        |
| 5.3.2.4.1  | Concentración  | 123        |
| 5.3.2.4.2  | En el Citoplasma de los Restos Celulares   | 125        |
| 5.3.2.4.3  | En el Citoplasma de Células Epiteliales  | 126        |
| 5.3.2.4.4  | En el Citoplasma de Macrófagos   | 126        |
| 5.3.2.4.5  | Asociados a Detritus   | 127        |
| 5.3.2.4.6  | En el Citoplasma de Células Espermatogénicas   | 128        |
| 5.3.2.4.7  | Análisis Estadístico de la Presencia de Cuerpos Reticulares por Diagnóstico Microbiológico             | 129        |
| 5.4        | ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD PARA LA IFD CONTRA CHLAMYDIA TRACHOMATIS EN EL CORTE SEMFINO. | 129        |
| <b>6.</b>  | <b>DISCUSION.....</b>  | <b>130</b> |
| <b>7.</b>  | <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>168</b> |
| <b>8.</b>  | <b>RESUMEN.....</b>  | <b>169</b> |
| <b>9.</b>  | <b>SUMMARY.....</b>  | <b>171</b> |
| <b>10.</b> | <b>REFERENCIAS.....</b>  | <b>174</b> |

## Lista de Figuras

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>Figura 1.</b>   | Representación del ciclo de desarrollo de <i>C. trachomatis</i> .  | 13 |
| <b>Figura 2.</b>   | Taxonomía del orden Chlamydiales.  | 14 |
| <b>Figura 3.</b>   | Interacción de <i>C. trachomatis</i> y <i>Mycoplasmas</i> con leucocitos en semen de hombres infértiles o subfértiles, y Colocalización de los dos tipos de bacterias.   | 33 |
| <b>Figura 4.</b>   | Fagocitosis de espermatozoides en muestras seminales de hombres subfértiles o infértiles infectados con <i>C. trachomatis</i> y <i>Mycoplasmas</i> . Etapas tempranas de la adherencia de la cabeza del espermatozoide a la superficie de los leucocitos y etapas tardías con las cabezas de espermatozoides rodeadas por pseudópodos de los leucocitos. | 34 |
| <b>Figura 5.</b>   | Daño de los espermatozoides en muestras seminales de hombres subfértiles infectados con <i>C. trachomatis</i> y <i>Mycoplasmas</i> .   | 35 |
| <b>Figura 6.</b>   | Anormalidades espermáticas y alteraciones ultraestructurales observadas en el semen de los pacientes subfértiles infectados con <i>C. trachomatis</i> y <i>Mycoplasma</i> .  | 36 |
| <b>Figura 7.</b>   | Imagen panorámica del corte semifino de líquido seminal en la que se observa restos celulares y espermatozoides con signos de autólisis asociados a la presencia de bacterias.   | 36 |
| <b>Figura 8a.</b>  | Distribución de la casuística según el tipo de infertilidad y el diagnóstico microbiológico. Infertilidad Primaria e Infertilidad Secundaria.  | 50 |
| <b>Figura 8b.</b>  | Antecedentes Clínicos de Infección Genitourinaria de los hombres infértiles incluidos en el estudio.   | 51 |
| <b>Figura 8c.</b>  | Presencia de alteraciones en los seminogramas previos presentes en los hombres infértiles.   | 52 |
| <b>Figura 9a.</b>  | Antecedentes de infección genitourinaria en las cónyuges de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 53 |
| <b>Figura 9b.</b>  | Antecedentes de tratamientos previos contra infección genitourinaria en las cónyuges de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 54 |
| <b>Figura 10a.</b> | Volumen del líquido seminal de los hombres infértiles incluidos en el estudio.   | 58 |
| <b>Figura 10b.</b> | Color del líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre el grupo control y el grupo de pacientes. Porcentaje de casos que presentaron este rasgo.   | 58 |
| <b>Figura 10c.</b> | Color del líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre los grupos según el diagnóstico microbiológico. Porcentaje de casos con este rasgo.   | 59 |

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>Figura 10d.</b> | Viscosidad del líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre los grupos atendiendo al diagnostico microbiológico. Porcentaje de casos que presentaron éste rasgo.   | 59 |
| <b>Figura 10e.</b> | pH del líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre control, todos los pacientes y los grupos según el diagnostico microbiológico.   | 60 |
| <b>Figura 11.</b>  | Concentración de espermatozoides en millones por mililitro de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre control, todos los pacientes y los grupos atendiendo al diagnostico microbiológico.             | 61 |
| <b>Figura 12a.</b> | Vitalidad espermática. Espermatozoides vivos (transparentes y sin contraste); espermatozoides muertos (color rojo). Prueba de Eosina amarilla al 0.1%. Microscopia de campo claro, 100x.   | 62 |
| <b>Figura 12b.</b> | Viabilidad espermática de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre control, todos los pacientes y los grupos según el diagnóstico microbiológico.   | 63 |
| <b>Figura 13a.</b> | Espermatozoides con movimiento progresivo total en fresco. Comparaciones entre el grupo control y el grupo de pacientes.   | 64 |
| <b>Figura 13b.</b> | Espermatozoides con movimiento progresivo rectilíneo en fresco. Comparaciones entre el grupo control y el grupo de pacientes.  | 65 |
| <b>Figura 14a.</b> | Espermatozoides con morfología espermática anormal. Comparaciones entre control, todos los pacientes y los grupos según el diagnostico microbiológico.   | 67 |
| <b>Figura 14b.</b> | Alteraciones de la morfología espermática.   | 70 |
| <b>Figura 15.</b>  | Cambios Citológicos de Tipo Inflamatorio presentes en el líquido seminal de los pacientes incluidos en el estudio.   | 75 |
| <b>Figura 16a.</b> | Presencia de Cuerpos Elementales y reticulares de Chlamydia trachomatis. Comparación de las observaciones realizadas en el corte semifino teñido con azul de toluidina y con Isotiocianato de fluoresceína a 1000 aumentos. Superposición de imágenes. | 78 |
| <b>Figura 16b.</b> | Leucocitos polimorfonucleares en muestras de líquido seminal de los pacientes.   | 80 |
| <b>Figura 17.</b>  | Múltiples células fagocíticas cuya morfología nuclear corresponde a la de leucocitos polimorfonucleares y que presentan espermatozoides adosados a su superficie y bacterias incluidas en el citoplasma (flecha blanca).                               | 81 |
| <b>Figura 18.</b>  | Células fagocíticas con citoplasma multiloculado, presentan bacterias adheridas a la membrana y libres en el plasma seminal. Se observan además espermatozoides y bacterias fagocitados. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.         | 81 |
| <b>Figura 19.</b>  | Numero de macrófagos observados en los concentrados celulares de líquido seminal incluidos en resina de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 82 |

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| <b>Figura 20.</b>  | Presencia de macrófagos activos observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 82 |
| <b>Figura 21.</b>  | El contenido fagocitado es de aspecto finamente granular y en el citoplasma se aprecian áreas tenuemente multiloculadas sugestivas de cuerpos reticulares (flecha blanca). Se observan además bacterias libres en el espacio extracelular (*). La flecha amarilla señala una célula fagocítica con un espermatozoide adherido a su superficie (flecha amarilla).Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.   | 83 |
| <b>Figura 22.</b>  | Presencia de macrófagos con inclusiones bacterianas observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 84 |
| <b>Figura 23.</b>  | Presencia de macrófagos con fagocitosis inespecífica observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.   | 85 |
| <b>Figura 24a.</b> | Se aprecian múltiples células fagocíticas conteniendo material nuclear de electrodensidad compatible con la de los espermatozoides, de localización intracitoplasmática y adosados a la membrana de los macrófagos (Flecha Blanca). Se aprecian además vesículas de contenido finamente granular en el interior de los macrófagos, bacterias adheridas a su superficie y libres en el espacio extracelular (Flecha amarilla)Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro. | 85 |
| <b>Figura 24b.</b> | Presencia de macrófagos con fagocitosis espermática observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 86 |
| <b>Figura 25a.</b> | Macrófagos con bacterias adheridas. En ésta imagen destaca la presencia de células fagocíticas de citoplasma vacuolado, algunas de las cuales contienen partículas bacterianas (Flecha Blanca). Adheridos a la membrana plasmática y rodeada por pseudópodos, se observan bacterias y espermatozoides (Flecha amarilla). También se observan restos citoplásmicos con bacterias incluidas y detritus celulares (*). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.         | 87 |
| <b>Figura 25b.</b> | Presencia de macrófagos con bacterias adheridas observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 87 |
| <b>Figura 26.</b>  | Espermiófagos gigantes. Imágenes en la que se observan células fagocíticas de citoplasma multivacuolado con bacterias incluidas, espermatozoides y bacterias adheridas a la membrana plasmática. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.  | 88 |
| <b>Figura 27.</b>  | Presencia de espermiófagos gigantes observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 89 |
| <b>Figura 28.</b>  | Presencia de células epiteliales observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.   | 90 |
| <b>Figura 29.</b>  | Células epiteliales presentes en el líquido seminal de pacientes infértiles. El citoplasma es de aspecto granular con bacterias adheridas a la membrana plasmática y localizadas en el espacio extracelular y bacterias de morfología compatible con cuerpos elementales  |    |

|                   |  |     |
|-------------------|--|-----|
|                   | de Chlamydia, una de ellas presenta en una zona cercana al núcleo una estructura compatible con un cuerpo reticular. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.   | 91  |
| <b>Figura 30.</b> | Se observan múltiples restos citoplásmicos de aspecto finamente multiloculado con partículas bacterianas adheridos y en el interior de los restos citoplásmicos, morfológicamente compatibles con cuerpos elementales de Chlamydia (flecha gruesa), y Mycoplasma (flecha delgada). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.   | 92  |
| <b>Figura 31.</b> | Presencia de restos citoplásmicos observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.   | 93  |
| <b>Figura 32.</b> | Presencia de restos citoplásmicos con bacterias incluidas y adheridas observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.   | 94  |
| <b>Figura 33.</b> | La imagen muestra una extensa área de detritus celulares en la que se encuentran inmersos espermatozoides y bacterias. También se observan restos citoplásmicos de aspecto multilocular. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.   | 95  |
| <b>Figura 34.</b> | Filamentos irregulares en el corte semifino. Se observan cuerpos fibrilares intensamente basófilos asociados a restos citoplásmicos y a detritus celulares. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.  | 96  |
| <b>Figura 35.</b> | Presencia de filamentos irregulares observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.   | 96  |
| <b>Figura 36.</b> | Cuerpos amiláceos presentes en el líquido seminal. Estructuras ovoides o poliédricas con las características formaciones laminares concéntricas. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.   | 97  |
| <b>Figura 37.</b> | Presencia Cocos observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.   | 102 |
| <b>Figura 38.</b> | Bacterias cocoides adheridas a células epiteliales, en el interior de restos celulares y libres en el espacio extracelular (Flecha). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.   | 102 |
| <b>Figura 39.</b> | Concentración de bacterias pleomórficas observadas presentes en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 105 |
| <b>Figura 40.</b> | Numerosas partículas basófilas de diámetro menor a 300 nm, de forma esférica u ovoide de contorno poco definido se observaron ampliamente distribuidas libres en el plasma seminal, adheridas a espermatozoides y dentro del citoplasma de la pieza media del mismo. Se vieron también adheridas y en el citoplasma de los restos celulares, de las células inflamatorias y de las células epiteliales, además de encontrarse inmersas en áreas de detritus celulares (flechas). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro. | 106 |



- 
- Figura 41.** Porcentaje de pacientes con bacterias pleomórficas adheridas y dentro de los restos citoplásmicos observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. 107
- Figura 42.** Porcentaje de pacientes con bacterias pleomórficas adheridas y en el citoplasma de células epiteliales, observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. 108
- Figura 43.** Porcentaje de pacientes con bacterias pleomórficas adheridas y dentro de los espermatozoides, observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. 110
- Figura 44.** Las flechas señalan gran cantidad de partículas bacterianas de 300 a 500 nm de diámetro, intensamente basófilas, generalmente esféricas, de contorno regular, rodeadas característicamente de un halo periplasmático se observaron constantemente en los cortes semifinos del líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en éste estudio. La localización de los cuerpos elementales de clamidia como se aprecia en las imágenes fue tanto intracelular como extracelular y afectó prácticamente a cualquier células presente en la muestra. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro. 114
- Figura 45.** Concentración de bacterias de morfología compatible con Chlamydia observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. 115
- Figura 46.** Porcentaje de pacientes con bacterias de morfología compatible con Chlamydia, adheridas y dentro de los restos celulares presentes en el líquido seminal de de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. 116
- Figura 47.** Porcentaje pacientes con cuerpos elementales de Chlamydia adheridos y en el citoplasma de macrófagos observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. 118
- Figura 48.** Porcentaje pacientes con cuerpos elementales de Chlamydia adheridos y dentro de los espermatozoides, observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. 120
- Figura 49.** Porcentaje pacientes con cuerpos elementales de Chlamydia adheridos y en el citoplasma de las células espermatogénicas, observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. 121
- Figura 50.** Las imágenes muestran campos microscópicos en los que se pueden observar tanto cuerpos elementales intra y extracelulares. Con las flechas se señalan células con cuerpos reticulares de clamidia y vacuolas fagocíticas. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro 124
- Figura 51.** Cuerpos reticulares de chlamydia presentes en el concentrado celular de líquido seminal de los pacientes incluidos en el estudio. 125

|                   |   |     |
|-------------------|---|-----|
| <b>Figura 52.</b> | Porcentaje pacientes con cuerpos reticulares de Chlamydia presentes en el citoplasma de macrófagos, observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. | 127 |
| <b>Figura 53.</b> | Porcentaje pacientes con cuerpos reticulares de Chlamydia asociados a detritus celulares, observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.           | 127 |

## Lista de tablas

|                    |   |     |
|--------------------|---|-----|
| <b>Tabla I.</b>    | Serotipificación y tropismo de Chlamydia trachomatis.   | 11  |
| <b>Tabla II.</b>   | Distribución de las muestras en los distintos pocillos.   | 43  |
| <b>Tabla III.</b>  | Antecedentes clínicos y de diagnóstico de los hombres incluidos en el estudio.  | 55  |
| <b>Tabla IIIa.</b> | Antecedentes clínicos y de diagnóstico de las mujeres.  | 56  |
| <b>Tabla IIIb.</b> | Antecedentes gineco-obstétricos de las cónyuges de los pacientes incluidos en el estudio.   | 56  |
| <b>Tabla IIIc.</b> | Antecedentes de tratamientos previos de reproducción asistida realizados en las cónyuges de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.         | 57  |
| <b>Tabla IVa.</b>  | Resultados del seminograma. Parámetros fisicoquímicos de líquido seminal de los pacientes incluidos en el estudio.                                    | 71  |
| <b>Tabla IVb.</b>  | Parámetros fisicoquímicos de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.   | 71  |
| <b>Tabla Va.</b>   | Parámetros fisicoquímicos de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Concentración (Conc) y vitalidad espermática (Vit). | 71  |
| <b>Tabla Vb.</b>   | Parámetros fisicoquímicos de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Viabilidad espermática.                             | 72  |
| <b>Tabla VI.</b>   | Patrón de motilidad espermática de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 72  |
| <b>Tabla VIIa.</b> | Morfología espermática alterada en los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 73  |
| <b>Tabla VIIb.</b> | Frecuencia de alteraciones morfológicas de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.  | 73  |
| <b>Tabla VIIa.</b> | Cambios citológicos de tipo inflamatorio presentes en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.                         | 76  |
| <b>Tabla VIIb.</b> | Cambios citológicos de tipo inflamatorio presentes en el líquido seminal de los pacientes incluidos en el estudio.                                    | 76  |
| <b>Tabla IXa.</b>  | Cambios inflamatorios observados en los cortes semifinos del líquido seminal.   | 97  |
| <b>Tabla IXb.</b>  | Resultados de la Inmunofluorescencia directa aplicada al concentrado celular incluido en epoxiresina.   | 100 |

|                    |  |     |
|--------------------|--|-----|
| <b>Tabla X.</b>    | Presencia de bacterias en forma de cocos en el corte semifino del líquido seminal.     | 103 |
| <b>Tabla XI.</b>   | Presencia de bacterias pleomórficas en el corte semifino del líquido seminal.          | 111 |
| <b>Tabla XII.</b>  | Presencia de cuerpos elementales de clamidia en el corte semifino del líquido seminal. | 122 |
| <b>Tabla XIII.</b> | Presencia de cuerpos reticulares de clamidia en el corte semifino del líquido seminal. | 128 |

## ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| ADN     | Ácido desoxiribonucleico   |
| ADNasas | Desoxiribonucleasas específicas de ADN que catalizan la ruptura de los enlaces fosfodiéster. |
| ADNr    | Ácido Desoxirribonucleico ribosomal  |
| API     | Sistema de identificación bioquímica   |
| ARN     | Ácido Ribonucleico   |
| ARNr    | Ácido Ribonucleico ribosomal   |
| ATP     | Adenosín trifosfato  |
| bcl-2   | B-cell lymphoma 2  |
| BPM     | Bacterias pleomórficas   |
| CDC     | Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de Norteamérica    |
| CE      | Cuerpo elemental   |
| CHSP60  | <i>Chlamydia trachomatis</i> heat shock protein 60   |
| Conc    | Concentración  |
| CP3     | Cisteín proteasa 3   |
| CP9     | Cisteín proteasa 9   |
| CR      | Cuerpo reticular   |
| DEAE    | Diethylaminoethyl cellulose  |
| DFA     | Direct fluorescent antibody  |
| DNA     | Deoxyribonucleic acid  |
| EIA     | Enzimo inmunoanálisis  |
| EIP     | Enfermedad inflamatoria pélvica  |
| EMB     | Eosin methylene blue   |
| ETS     | Enfermedad de transmisión sexual   |
| GIFT    | Gamete Intra-Fallopian Transfer  |
| GLUT3   | Glucose transporter 3  |
| GLUT8   | Glucose transporter 4  |
| GroEL   | Gen Codificante de Hsp60   |

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrógeno   |
| HC2                           | Hybrid Capture 2  |
| Hela 229                      | Línea de células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical (Henrietta Lacks) |
| ICSI                          | Inyección intracitoplasmática de espermatozoides  |
| IFD                           | inmunofluorescencia directa   |
| IgA                           | Inmunoglobulina A   |
| IgG                           | Inmunoglobulina G   |
| IgM                           | Inmunoglobulina M   |
| IGU                           | Infección genitourinaria  |
| IUI                           | Inseminación intrauterina   |
| IL-10                         | Interleucina 10   |
| IL-12                         | Interleucina 12   |
| IL-18                         | Interleucina 18   |
| IL-6                          | Interleucina 6  |
| IL-8                          | Interleucina 8  |
| IVF                           | In vitro fertilization  |
| kDa                           | KiloDaltons   |
| KDO                           | 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid   |
| LGV                           | Linfogranuloma venéreo  |
| LPS                           | Lipopolisacárido  |
| M                             | Molar   |
| Max                           | Máxima  |
| Me                            | Mediana   |
| Min                           | Mínima  |
| mL                            | Mililitro   |
| MOMP                          | Major outer membrane protein  |
| NAAT                          | Nucleic Acid Amplification Tests  |
| NADPH                         | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase   |
| nm                            | Nanómetros  |
| <i>Omp1</i>                   | Major Outer Membrane Protein Gene   |
| <i>OmpA</i>                   | Outer Membrane Protein A  |
| <i>ompB</i>                   | Outer Membrane Protein B  |
| PACE2                         | Phosphonoacetate 2  |
| PCR                           | Polymerase Chain Reaction   |
| pH                            | Potential of Hydrogen   |

|        |  |
|--------|--|
| POC    | Point of care  |
| ROS    | Reactive Oxygen Species                                      |
| RPM    | Revoluciones por minuto                                      |
| SCD    | Sperm Chromatin Dispersion                                   |
| SPSS   | Statistical Package for the Social Sciences                  |
| STORCH | Sífilis, toxoplasma, rubeola, citomegalovirus, herpes virus. |
| TARP   | Translocated actin recruiting phosphoprotein                 |
| Th1    | T helper 1   |
| Th2    | T helper 2   |
| VIH    | Virus de Inmunodeficiencia Humana                            |
| Vit    | Vitalidad Espermática  |
| Vol    | Volumen  |
| VPH    | Virus de Papiloma Humano                                     |
| WHO    | World Health Organization                                    |
| X      | Media  |
| μl     | Microlitros  |
| μm     | Micrómetros  |



## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 PATOLOGÍA INFLAMATORIA DEL TRACTO GENITAL MASCULINO ASOCIADA A *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Las infecciones constituyen, sin duda, la patología más frecuentemente encontrada en el sistema reproductor masculino, incluyendo las glándulas accesorias. La prostatitis, la epididimitis y la orquitis, han representado grandes tópicos dentro de la Andrología (Weidner *et al.*, 1987 y 1998).

Se ha referido reiterativamente que las infecciones del tracto genitourinario masculino son la causa de alrededor del 15% de los casos de infertilidad. Ya que las infecciones pueden afectar varios sitios del tracto reproductor masculino, los espermatozoides también pueden ser consecuentemente afectados por infecciones urogenitales a diferentes niveles de su desarrollo, maduración y transporte. En la mujer está todavía en discusión la relevancia de las infecciones a nivel cervical (Pellati *et al.*, 2008).

La uretritis por *Chlamydia trachomatis* ha sido considerada como el tipo de infección más común en hombres, aunque se estima que raramente produce secuelas. La mayor parte de los cuadros de uretritis son considerados como la manifestación de episodios de agudización de infecciones genitourinarias crónicas y asintomáticas que pueden ubicarse en cualquier punto de la vía espermática, en la extensa superficie de las glándulas accesorias, en el epidídimo e, incluso, en el testículo (Schiefer, 1998).

En hombres heterosexuales, la infección por *Chlamydia trachomatis* frecuentemente es uretral y los síntomas son muy parecidos a los de la gonorrea: secreción uretral y disuria. En los Estados Unidos de Norteamérica, según los informes del Center for Disease Control and Prevention (CDC) en 1993, las infecciones del tracto reproductor distal debidas a *Chlamydia trachomatis* representaron del 30 al 40% de los 4 a 6 millones de consultas anuales por uretritis no gonocócicas, y fueron la causa de 7,000 hospitalizaciones por epididimitis de hombres adolescentes y adultos jóvenes (CDC, 2009; Washington *et al.*, 1987).

La infección de glándulas accesorias masculinas es consecuencia de la dispersión canalicular de agentes infecciosos desde la uretra hacia la glándula prostática, las vesículas seminales, los conductos deferentes, los epidídimos y los testículos. Las infecciones hematógenas son raras. Estas infecciones se caracterizan por presentar leucocitospermia, concentración aumentada de citoquinas y especies reactivas de oxígeno en el líquido seminal. Las complicaciones pueden ser: obstrucción de los conductos de excreción del

epidídimo, daño en la espermatogénesis, orquitis, función espermática alterada y disfunciones de las glándulas accesorias masculinas, con la consecuente reducción de la fertilidad masculina. (Krause, 2008). En específico para *Chlamydia trachomatis*, las consecuencias de la infección pueden ser orquitis/epididimitis, prostatitis, infertilidad y obstrucción uretral (Trei *et al.*, 2008).

Las próstato-vesiculitis clamidiales, que constituyen aproximadamente un tercio de las infecciones inespecíficas no bacterianas de éstas glándulas, son generalmente crónicas, permanecen asintomáticas durante mucho tiempo, alteran la calidad seminal, el potencial de fertilidad del varón y requieren un tratamiento antibiótico que en la mayoría de los casos debe prolongarse varios meses (Weidner *et al.*, 1998). Diversos autores han reportado que *Chlamydia trachomatis* es el germen más frecuentemente encontrado en los pacientes que sufren uretritis y epididimitis no gonocócicas (Berger *et al.*, 1979) así como prostatitis crónica (Ostaszewska *et al.*, 1998). Las publicaciones más recientes refieren que *Chlamydia trachomatis* es el agente etiológico en el 39,5% de las prostatitis (Cunningham y Beagley, 2008).

En hombres jóvenes (menos de 35 años), la epididimitis es generalmente de transmisión sexual, reconociéndose a la *Chlamydia trachomatis* como el germen causal más común (Zdrodowska-Stefanow *et al.*, 2000). En pacientes con epididimitis aguda también se pueden encontrar *Ureaplasma urealyticum*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Krieger, 1984). La epididimitis puede ser el resultado de un ascenso retrógrado de patógenos uretrales a través de los conductos eyaculadores y de los conductos deferentes. La epididimitis sexualmente transmitida se acompaña a menudo de uretritis, con disuria, irritación uretral y descarga mucopurulenta. Sin embargo, más del 40% de los hombres infectados a nivel del epidídimo con *Chlamydia trachomatis* no reportan síntomas.

El término de orquiepididimitis se refiere a la inflamación del epidídimo acompañada de la inflamación del testículo. En jóvenes adultos de entre 20 y 40 años de edad, el agente causal predominante es *Chlamydia trachomatis* junto con la *Neisseria Gonorrhoeae*, en cambio, en menores de 25 años y pubertos, las principales causantes de orquiepididimitis son enterobacterias (Delavierre, 2003; Trojian, 2009). Hombres con epididimitis y orquitis típicamente presentan un inicio gradual de síntomas, fiebre y dolor escrotal del tracto urinario bajo. Estos signos y síntomas ayudan a diferenciar epididimitis y orquitis de la torsión testicular, entidad que conduciría a una cirugía de emergencia. Estudios de

laboratorio, incluyendo la tinción de Gram de la secreción uretral, el uroanálisis, el urocultivo y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria Gonorrhoeae*, pueden ayudar a determinar el tratamiento a seguir (Delavierre, 2003).

Mientras que en hombres heterosexuales, la infección por *Chlamydia trachomatis* es frecuentemente es uretral, en hombres homosexuales, el recto es el sitio común de infección por éste germen; la proctocolitis chlamydial es generalmente asintomática, pero pueden llegar a causar síntomas característicos, como descargas rectales y dolor durante la defecación (Schachter, 1990).

La mayoría de los hombres portadores de la *Chlamydia trachomatis* en la mucosa uretral son asintomáticos la mayor parte del tiempo y pueden, sin saberlo, infectar a su pareja, quien desarrolla secuelas mayores (Washington *et al.*, 1987; Weidner *et al.*, 1987).

Desde finales de la década de los años ochenta, se reconoce a *Chlamydia trachomatis* como la causa más importante de las alteraciones de la reproducción humana, siendo en los países industrializados el microorganismo que más frecuentemente se transmite por vía sexual (Paavonen y Wolner-Hanssen, 1989; Westrom, 1990; Pavoneen y Eggert-Kruse, 1999).

## **1.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN UROGENITAL POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS***

En los últimos años de la década de los sesenta, con los cambios en el estilo de vida de la revolución sexual, se puso en claro que la *Chlamydia trachomatis* podía ser transmitida por vía sexual (Oriel *et al.*, 1972) y para finales de los años setenta fue reconocida además como la más frecuente de las infecciones bacterianas de transmisión sexual (Schachter *et al.*, 1975; Woolfitt y Watt, 1977). Actualmente se estima el total de infecciones por *Chlamydia trachomatis* en alrededor de 92 millones de casos por año, cifra que se asume que esta subestimada (WHO, 2001).

El carácter epidémico de este tipo de infección y la dificultad para su control, se deben a que un alto porcentaje de pacientes infectados permanecen sin tratamiento por ser enfermedades frecuentemente asintomáticas, y ser causadas por gérmenes pobremente evaluados (McGregor y French, 1997; Howell *et al.*, 1998; Schachter y Grossman, 2001).

La prevención y tratamiento de las infecciones genitourinarias en la población sexualmente activa, constituyen uno de los aspectos más importantes para la disminución de complicaciones gineco-obstétricas e infecciones perinatales (Cassell *et al.*, 1993). Se considera que el inicio temprano de la actividad sexual, y el tener varias parejas sexuales, incrementa el riesgo de contraer infecciones, sobre todo las inespecíficas que pueden comprometer la capacidad reproductiva de la pareja (Nuñez-Troconis, 1999). A la par de las infecciones genitourinarias masculinas por *Chlamydia trachomatis* para la mujer, aparece la clamidiosis genital como la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en jóvenes de 15 a 19 años (Terán *et al.*, 2001) y la que produce una mayor incidencia de enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) (Paavonen y Eggert-Kruse, 1999). El daño tubo peritoneal parece ser la manera en que los microorganismos interfieren en la fertilidad femenina. *Chlamydia trachomatis* es considerada la causa de mayor importancia de laceraciones y obstrucción tubárica enfermedad pélvica inflamatoria, y el síndrome adherencial (Pellati *et al.*, 2008).

La infección genital causada por *Chlamydia trachomatis*, es la enfermedad bacteriana de transmisión sexual más común en todo el mundo con un total de 90 a 92 millones de casos nuevos al año (Gerbase *et al.*, 1998).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, hacia el año 2001 en los Estados Unidos de América se calculaban 4 millones de casos nuevos anuales (WHO, 2001) y de acuerdo a datos del CDC, se calculaba el costo anual ocasionado por la infección en más de dos mil millones de dólares.

En los Estados Unidos de Norteamérica, se registraron más de un millón de casos nuevos de infecciones por *Chlamydia* en 2007, mientras que la cantidad estimada de personas infectadas fue de alrededor de 3 millones (CDC, 2009; Weinstock, 2004).

Durante la última década, la tasa de detección de *Chlamydia trachomatis* se ha incrementado, debido a la aplicación de técnicas más sensibles para la identificación para éste germen y un aumento en el número de programas su detección. La infección puede ocurrir a cualquier edad, pero los picos de mayor incidencia se encuentran en los grupos de 16-25 años, que incluyen personas en las que se suelen identificar comportamientos considerados de alto riesgo.

Las trabajadoras sexuales, hombres homosexuales, adultos jóvenes solteros y “*swingers*”, son considerados grupos de riesgo importante (Dukers-Muijers, 2010; van



Weel, 2004; Znazen, 2010). Monavi (2006), ha referido como factores de riesgo para la infección por *Chlamydia trachomatis* el tener múltiples parejas sexuales y la práctica de relaciones sexuales sin protección. En los EE.UU, se registraron más de un millón de casos nuevos de infecciones por Clamidia en 2007, mientras que la cantidad estimada de personas infectadas fue de alrededor de 3 millones (CDC, 2009; Weinstock *et al.*, 2000).

En la última década, la incidencia de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* en Europa también ha ido en aumento. En 2005, más de doscientos mil casos fueron declarados en 17 países europeos, esto sin duda es una cifra subestimada, ya que sólo en los Países Bajos se informa de una incidencia de sesenta mil casos de infecciones por *Chlamydia trachomatis* anualmente (RIVM, 2008; van Bergen *et al.*, 2005). Esta subestimación se puede deber al curso asintomático en la mayoría de los casos de éstas infecciones y a la falta de diagnóstico de esta bacteria en otros países.

### **1.3 INFECCIONES CRÓNICAS POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS, SECUELAS CICATRICIALES Y SUS COMPLICACIONES**

Entre las enfermedades asociadas al género *Chlamydiophyla*, quedan comprendidas una gran variedad de padecimientos que afectan al humano y varias especies de mamíferos y aves. Algunas como el tracoma (la primera causa de ceguera prevenible en el mundo) son de gran importancia por ser incapacitantes y asociadas a la pobreza; otras, como las infecciones genitales internas, son reconocidas por ser enfermedades de transmisión sexual de alta incidencia. Desde hace varias décadas se cita a la *Chlamydia trachomatis* como la bacteria más común de éste tipo de padecimientos y las campañas de promoción de la salud y de prevención de la salud, la enfocan exclusivamente como germen de transmisión sexual.

La especie *Chlamydia trachomatis* comprende una colección de bacterias cocoides intracelulares con impacto reconocido para la salud humana. La *Chlamydia trachomatis* puede colonizar diferentes tipos de tejido como la conjuntiva, la orofaringe, el cérvix uterino, la uretra, el recto, los nódulos linfáticos, y conducir a una variedad de enfermedades humanas dependiendo del sitio anatómico de infección. Empleando métodos de alta sensibilidad, se ha podido detectar *Chlamydia trachomatis* en células mononucleares de sangre periférica, en lesiones de la piel y líquido sinovial (Carter *et al.*, 2008 y 2010).

Una infección urogenital causada por *Chlamydia trachomatis* puede provocar uretritis en los hombres, y en las mujeres, cervicitis, vaginitis y uretritis. Como la mayoría de las infecciones son asintomáticas (mujeres: 70%, hombres: 50%), la gran mayoría de las infecciones pueden pasar inadvertidas y por lo tanto no se les da tratamiento (van de Laar, 2007). Los síntomas en los hombres son la disuria y secreción uretral, estas ocurren de 7 a 21 días después de la infección primaria. Las complicaciones en el hombre pueden ser epididimitis, prostatitis y artritis reactiva (Peipert, 2003). En este momento, el papel de la infección por *Chlamydia trachomatis* en el desarrollo de la infertilidad masculina no se explica completamente, ya que existen resultados contradictorios en las diferentes publicaciones (Cengiz *et al.*, 1997; De-Barbeyrac, 2006). Se sugiere que la infertilidad masculina, es causada por estenosis de los conductos deferentes debido a la inflamación previa.

La artritis reactiva (anteriormente llamada Síndrome Reiter) puede ser desencadenada por una infección urogenital por *Chlamydia trachomatis* y se observa con mayor frecuencia en los hombres (Hicks, 2008). Además de la tríada de uretritis, conjuntivitis y artritis, una artritis reactiva también puede dar lugar a lesiones mucocutáneas en pene, boca, manos y pies (Quint, 2010).

La infección por *Chlamydia trachomatis* en la mayoría de las mujeres también suele ser asintomática, pero los síntomas en caso que se presenten pueden ser: secreción mucopurulenta o sangrado vaginal post-coital. Una infección cervical por *Chlamydia trachomatis* podría inducir una infección ascendente causando endometritis, salpingitis, EIP y perihepatitis (Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis). Parece que la mayoría de las complicaciones descritas son el resultado de las infecciones asintomáticas por *Chlamydia trachomatis* (Morre *et al.*, 2002). En Europa, las infecciones por *Chlamydia trachomatis* son responsables de al menos el 60% de los casos de EIP (Rogsstad, 2008). La EIP puede conducir a las severas complicaciones tardías de la reproducción, debido principalmente a las adherencias tubáricas.

Se estima que dos tercios de las mujeres con infertilidad por factor tubario y un tercio de las mujeres con embarazos ectópicos tienen anticuerpos detectables contra *Chlamydia trachomatis* en suero, lo que indica una infección por *Chlamydia trachomatis* en una etapa temprana en la vida (Pavonen y Eggert-Kruse, 1999; Peipert, 2003).

El curso y la duración de una infección no tratada por *Chlamydia trachomatis*, no está totalmente claro. Sería relativamente fácil de investigar el curso y la duración de una infección no tratada por *Chlamydia trachomatis*, pero las consideraciones éticas, sobre el riesgo de salud es importante para las personas que no son tratadas, no podremos utilizar con facilidad los estudios de cohorte prospectivos y tendremos que limitar las investigaciones a los estudios retrospectivos. Sin embargo, es difícil determinar el momento exacto de una infección en una persona en estudios retrospectivos. Además, no es posible discernir entre una infección recurrente o persistente por *Chlamydia trachomatis*, aunque la genotipificación del germen pudiera dar un indicio.

Sin embargo, diversos estudios han investigado el curso natural de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* en un mínimo de estudios prospectivos y retrospectivos con un número de casos importantes (Geisler *et al.*, 2008; Joyner *et al.*, 2002; McComack *et al.*, 1979; Molano *et al.*, 2005; Morre *et al.*, 2002; Parks *et al.*, 1997; Rogers *et al.*, 2008; Sheffield, 2005; van den Brule, 2002). En general, aproximadamente 50% de las infecciones asintomáticas por *Chlamydia trachomatis* fueron resueltos de manera espontánea durante el primer año y no hubo complicaciones. Después de cinco años, el 95% de las mujeres tendrán resuelta la infección por *Chlamydia trachomatis* de manera espontánea sin tratamiento antibiótico. Los resultados indican un temor exagerado en la actualidad para las complicaciones debido a una infección por *Chlamydia trachomatis*.

#### **1.4 ASOCIACION DE INFECCIÓN E INFLAMACIÓN CRÓNICA CON LA ETIOLOGÍA DEL CÁNCER.**

En la actualidad, la infección e inflamación crónica de órganos del aparato genital interno masculino y femenino, se ha vuelto a enfocar con agudeza, debido a su posible relación etiológica con procesos de transformación maligna. El potencial carcinogénico de microorganismos intracelulares está siendo enfocado para su estudio con gran interés por muchos grupos de investigación. Algunas variantes de Virus de Papiloma Humano (VPH) para el cáncer cérvicouterino, del *Helicobacter pylori* en el carcinoma gástrico, cepas de *Escherichia coli* y el Virus de Epstein-Barr para el carcinoma nasofaríngeo y diferentes linfomas, el Herpes virus humano-8 para el sarcoma de Kaposi, el Virus Humano de la Leucemia de célula T tipo I, trematodos hepáticos para el colangiocarcinoma, *Chlamydia pneumoniae* en el cáncer de pulmón y la esquistosomiasis en el cáncer de vejiga, entre otros, modifican el ciclo celular de la célula que infectan y son inductoras de cáncer. (Biarc, 2004; Vaishnavi *et al.*, 2005 y Littman *et al.*, 2004).

En el caso de *Chlamydia trachomatis*, el estudio de la relación entre los procesos inflamatorios y las patologías neoplásicas de los órganos crónicamente infectados, se ha incrementado en los últimos 10 años.

Para el cáncer cérvico uterino, la infección por VPH carcinogénico es una causa necesaria (Bosh *et al.*, 2002; Walboomers *et al.*, 1999), sin embargo las infecciones por VPH son extremadamente frecuentes en relación con la incidencia del cáncer (Schiffman *et al.*, 2007). Algunos cofactores pueden incrementar el riesgo de que células infectadas por VPH progresen a la premalignidad y al cáncer invasivo. Muchos estudios (Smith *et al.*, 2002 y 2004; Antilla *et al.*, 2001; Koskela *et al.*, 2000; Madeleine *et al.*, 2007; Dillner *et al.*, 1997), pero no todos ellos (Castle *et al.*, 2003; Yoshikawa *et al.*, 1999), han observado que *Chlamydia trachomatis* está asociada con cáncer cervical o con tipos de VPH carcinogénicos persistentes.

En el hombre, el cáncer de próstata es el segundo en frecuencia después del cáncer de pulmón. Hasta ahora no hay datos contundentes que lo hayan confirmado, pero la asociación entre la prostatitis crónica por *Chlamydia trachomatis* y el cáncer prostático se sigue estudiando (Dennis *et al.*, 2002; Roberts, 2004). Antilla (2005) refirió la presencia de anticuerpos anti-*Chlamydia trachomatis* séricos en asociación el cáncer de próstata, sin encontrar una asociación positiva.

## 1.5 PERSPECTIVA HISTÓRICA DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Los primeros informes acerca de la presencia de *Chlamydia spp.* en patologías infecciosas se deben a las descripciones sobre tracoma hechas hace miles de años en documentos antiguos como son: el código de Hammurabi en China y en los Papiros de Hebers, en Egipto. Estos últimos hacen una descripción de la enfermedad como “exudativa y productora de cicatrices en el ojo”.

En México, Francisco Javier Clavijero Echegaray, jesuita veracruzano, refiere que en el siglo XVII trataban un padecimiento ocular cuyas manifestaciones clínicas coinciden con el tracoma. El tratamiento consistía en la eversión del párpado para frotar sobre la conjuntiva tarsal un cristal de sulfato de cobre tratando de eliminar los folículos. El Dr. Falk en 1872, hace mención a la presencia de tracoma en México y en 1887 se reconoce la presencia de conjuntivitis folicular tracomatosa en todo el territorio nacional.

Aunque el tracoma y el linfogranuloma venéreo se conocen desde hace varios cientos de años, su etiología permaneció sin conocerse hasta 1907, cuando Halberstädter y von Provazek, en trabajos realizados en la Isla de Java, inocularon secreciones de enfermos de tracoma en los ojos del orangután. Posterior a ello, descubrieron en preparados citológicos teñidos con Giemsa de las secreciones conjuntivales del orangután, que las células epiteliales contenían vacuolas intracitoplásmicas con numerosas partículas que describieron como “cuerpos punteados”, en su interior. Algunas de éstas partículas ahora reconocidas como cuerpos elementales, se detectaron también fuera de las células epiteliales. Las vacuolas intracitoplásmicas conteniendo gran cantidad de partículas se denominaron cuerpos reticulares (Halberstädter, 1907). Al ser estos cuerpos de gran tamaño, pensaron que se trataba de un protozooario confiriéndoles el nombre de *Chlamydozoaceae* (Baehr *et al.*, 1988; Bavoil, 1990).

En 1910 se confirmó la existencia de las mismas inclusiones en raspados del cérvix y en los años siguientes fueron descritas en células uretrales masculinas (García *et al.*, 2008).

En 1930, durante la gran epidemia de psitacosis europea, y principalmente en Alemania, Sir Samuel Bedson evidenció inclusiones intracitoplásmicas parecidas a las del tracoma a partir de los macrófagos de ratones inoculados por vía peritoneal con esputo de pacientes afectados por neumonía grave y hacia 1940 se describen de nuevo inclusiones en células obtenidas por punción de ganglios hipertrofiados de pacientes con linfogranuloma venéreo (Fagundo, 2000; Enrique-Laval, 2003). A finales de 1950, dos investigadores en Japón lograron reconocer los corpúsculos de *Chlamydia* utilizando la microscopia electrónica (Mandell, 1991).

Tang *et al.* mencionaron por primera vez la naturaleza del germen causal del tracoma reconociéndola como infección viral (Tang *et al.*, 1957), pero hacia 1960 la aplicación de técnicas de cultivo y microscopía electrónica sugirieron, por la presencia de ribosomas y estructuras propias de la pared celular, que *Chlamydia trachomatis* era una bacteria.

En México, en la región de los Altos de Chiapas, el tracoma es considerado endémico, estando afectadas las comunidades de Oxchuc, Chanal, Tenejapa, Huixtán y Cancuc. Este problema dio lugar a la creación del Instituto Mexicano de Oftalmología Tropical ubicado en el municipio de San Cristóbal de las Casas.

En 1963, Wang y Graystone describieron por primera vez la existencia de diferentes tipos de *Chlamydia trachomatis*; ellos inocularon *C. Trachomatis* en saco vitelino de

embriones y posteriormente inyectaron el extracto crudo a ratones para provocar la respuesta inmune. En algunos de esos ratones se desarrolló un mecanismo protector contra estas bacterias mientras que en otros quedaron parcialmente protegidos aparentemente por respuesta cruzada. Ésta reacción sugirió la existencia de diferentes serotipos de *Chlamydia trachomatis* (Wang y Grayston, 1963). Debido a la complejidad y consumo de tiempo de éstos métodos fue necesario desarrollar otros más sencillos, aplicables a estudios epidemiológicos a gran escala, lo que condujo a la implementación de pruebas de microinmunofluorescencia con anticuerpos policlonales y posteriormente a las pruebas más específicas de microinmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína mayor de la membrana externa (MOMP) de la *Chlamydia trachomatis* (Wang y Grayston, 1970; Wang *et al.*, 1985). Mientras que las pruebas de microinmunofluorescencia contribuyeron al mayor conocimiento de la etiología de los diferentes serovares de *Chlamydia trachomatis* en los inicios de la investigación de éste tema, ésta técnica fue reemplazada al final del siglo pasado por métodos de genotipificación más sensibles dirigidos a la codificación del gen determinante de la MOMP (*OmpA* gen). Actualmente diferentes tipos de métodos de genotipificación son usados en estudios de redes sexuales, estudios de filogenética y de distribución de serovares lo que ha redundado en un mejor entendimiento de la epidemiología y de las enfermedades asociadas etiológicamente específicamente a los diferentes serovares de *Chlamydia trachomatis*.

La proteína mayor de membrana externa (MOMP) es la proteína de *Chlamydia trachomatis* más estudiada y es codificada por el gen *OmpA*. La estructura de ésta proteína comprende cinco dominios constantes transmembranales y cuatro dominios variables hacia el exterior de la membrana. La diferencias en epítopes variables de la MOMP permite clasificar a las cepas de *Chlamydia trachomatis* en tres serogrupos mayores y 19 diferentes serovares: el serogrupo B (que comprende los serovares B, Ba, D, Da, E, L2, y L2a), el serogrupo C (que comprende los serovares A, C, H, I, Ia, J, K, L1 y L3) y el serogrupo intermedio al que corresponden los serovares F, G y Ga. (Kuo *et al.*, 1983; Ossewaarde, 1994) (Tabla I). Los serovares A, B y C son mayormente detectadas en muestras conjuntivales, mientras que los serovares D a K son principalmente encontrados en el tracto anogenital confinada a la pared de la mucosa como enfermedad de transmisión sexual. Los serovares D a K se han asociado a patologías como: conjuntivitis de inclusión, uretritis, cervicitis, salpingitis, proctitis, epididimitis, peritonitis, perihepatitis, neumonía en

neonatos e infecciones del tracto respiratorio superior (tonsilitis, faringitis, rinitis y otitis media).

En contraste, los serovares L1, L2 y L3, invaden la capa submucosa de los epitelios y los nódulos linfáticos causando el linfogranuloma venéreo (Dong *et al.*, 1998; Baboonian *et al.*, 2003; Magon *et al.*, 2005; McDonagh *et al.*, 2004; Simms, 2008).

**Tabla I.** Serotipificación y tropismo de *Chlamydia trachomatis*.

| CHLAMYDIA TRACHOMATIS               |                                    |         |                                |
|-------------------------------------|------------------------------------|---------|--------------------------------|
| Biotipo                             | Serotipo                           | Huésped | Sitio de Infección             |
| Tracoma                             | A, B, Ba, C                        | Humano  | Conjuntiva                     |
| Conjuntival, Genital y Respiratorio | D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, K | Humano  | Tracto urogenital              |
| LGV                                 | L1, L2, L2a, L3                    | Humano  | Tracto urogenital              |
|                                     |                                    |         | Conjuntiva                     |
|                                     |                                    |         | Tracto respiratorio            |
|                                     |                                    |         | Ganglios linfáticos inguinales |
|                                     |                                    |         | Tracto urogenital              |
| Ratón                               | 1 (MoPn. <i>Muridarum</i> )        | Ratón   | Recto                          |
|                                     |                                    |         | Tracto respiratorio            |

## 1.6 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y TAXONOMÍA DE LAS CLAMIDIAS

*Chlamydia trachomatis*, como todos los miembros de la orden Chlamydiales, es una bacteria gram-negativa, no móvil, con un ciclo de desarrollo bifásico caracterizado por la alternancia entre dos formas morfológicas. El cuerpo elemental esférico y electrodensito de 0,2 A 0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro, es la forma de localización extracelular, metabólicamente inactivo, sin actividad replicativa. El cuerpo elemental es responsable de la diseminación de la *Chlamydia trachomatis*, ya que es capaz de adherirse a la superficie e invadir las células epiteliales susceptibles.

La segunda forma morfológica de la *Chlamydia trachomatis* es el cuerpo reticular, de 0,6 a 1,0  $\mu\text{m}$  de diámetro, metabólicamente activo con capacidad replicativa, de localización intracelular y parasitismo obligado; ya que metabólicamente es deficiente para sintetizar ATP y requiere una fuente exógena de éste compuesto (Moulder, 1991).

*Chlamydia trachomatis* tiene la capacidad de infectar a una gran variedad de tipos celulares incluyendo células epiteliales y células presentadoras de antígeno; una vez que la Clamidia despierta la respuesta inmune celular, ésta es captada por histiocitos y macrófagos en los que sobrevive y se multiplica, pudiendo invadir el estroma conectivo

subyacente a los epitelios y eventualmente alcanzar el torrente circulatorio para diseminarse sistémicamente.

Su ciclo de vida es bifásico, cambiando de una forma libre a una intracelular. La primera corresponde a la fase infecciosa constituida por el cuerpo elemental, una esférula pequeña de 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, de pared rígida, que es resistente a factores ambientales adversos de forma semejante a una espora.

La fase intracelular del ciclo de vida de la *Clamidia* está representada por el cuerpo reticular, cuyo diámetro es de 0.6 a 1.5  $\mu\text{m}$ , de pared delgada, tiene actividad metabólica y se multiplica dentro de las vacuolas formadas por endocitosis en las células infectadas (Gerard *et al.*, 2002; Naaheimo *et al.*, 1999).

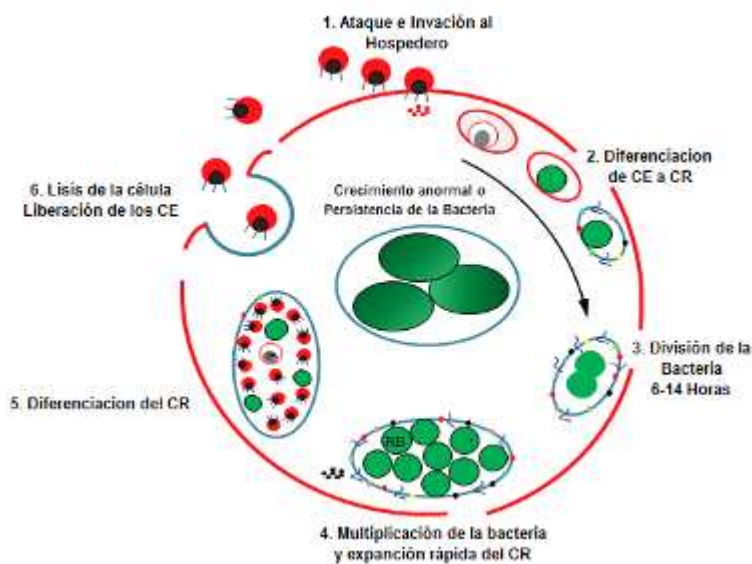
Los cuerpos elementales se liberan de las células del huésped al final del ciclo de infección e invaden nuevas células blanco, iniciándose otro ciclo de desarrollo para la bacteria. La incapacidad del sistema lisosomal de las células fagocíticas para eliminar a la *Clamidia* determina la tendencia a la cronicidad de la infección y se ha demostrado que este microorganismo puede persistir en el cérvix uterino, durante los 5 años de seguimiento sin ser eliminado del tracto genital (Dean *et al.*, 2000).

Después de la inoculación del germen mediante secreciones contaminadas, *Chlamydia trachomatis* se desplaza por mucosas húmedas y la infección se inicia con la adhesión del cuerpo elemental a la membrana de células epiteliales de revestimiento de las superficies expuestas. Después de su incorporación por endocitosis, la bacteria se multiplica en el interior de la vacuola fagocítica convirtiéndose en el cuerpo reticular (Schachter, 1990).

Los cuerpos elementales interactúan con la membrana celular en un proceso de dos etapas. Primero ocurre la adhesión inicial a expensas de interacciones electrostáticas de la MOMP de *Chlamydia trachomatis* con las cadenas de glicosaminoglicanos del sulfato de heparán presente en la superficie de las células epiteliales (Stephens *et al.*, 2001; Su y Caldwell, 1998; Su *et al.*, 1996; Taraktchoglou *et al.*, 2001). En la segunda etapa, la unión está posiblemente asociada con una disulfuro isomerasa, un componente del complejo receptor estrogénico (Davis *et al.*, 2002). Esta etapa de fijación irreversible va seguida inmediatamente por un fenómeno de secreción tipo III mediante el cual sucede la inyección de una fosfoproteína reclutadora de actina (TARP) hacia el citoplasma de la célula huésped. Dentro de la célula, el complejo TARP es rápidamente fosforilado y



desencadena la fagocitosis del cuerpo elemental adherido a la membrana de la célula huésped (Clifton *et al.*, 2004). Una vez que el cuerpo elemental entra a la célula por fagocitosis, se inicia la diferenciación a cuerpo reticular, más grande, metabólicamente activo y no infeccioso. El cuerpo reticular expresa tempranamente genes que se asocian con la modificación del cuerpo de inclusión, que evita que el cuerpo de inclusión entre a la vía endocítica conducente a la fusión lisosomal. Entre seis y catorce horas después de la fagocitosis, el cuerpo elemental inicia la replicación que resulta en un crecimiento expansivo del cuerpo de inclusión que llegará a contener más de 80 partículas de Clamidia. Aproximadamente 30 horas después de la fagocitosis, los cuerpos reticulares se diferencian a cuerpos elementales y son liberados por exocitosis o por lisis de la células huésped (Abdel-Rahman y Belland, 2005). (Fig. 1).



**Figura 1.** Representación del ciclo de desarrollo de *C. trachomatis*. La membrana citoplasmática de la célula huésped (línea roja) muestra depleción durante el ingreso de la bacteria con la formación de vesículas endocíticas y posterior activación y división de los cuerpos de inclusión hasta formar cuerpos reticulares los cuales son eliminados tras 72 horas posterior a la entrada. (Cocchiaro, 2009).

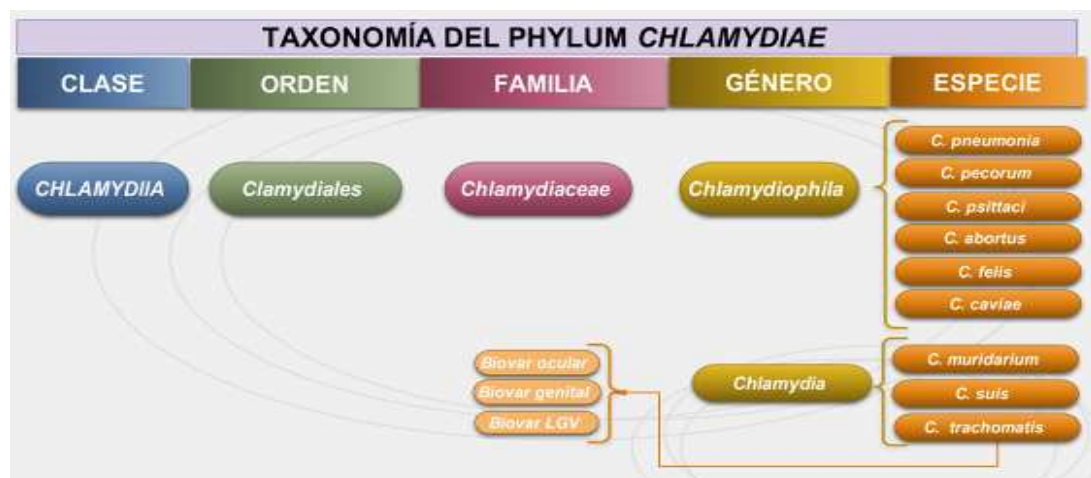
Respecto a la taxonomía de las Clamidias en la década de 1980, la especie *C. trachomatis*, género *Chlamydia*, es reconocida como un patógeno genital responsable de una variedad de síndromes clínicos y es clasificado dentro de la familia *Chlamydiaceae* junto con el género *Rickettsia* (Bergey, 2010). Como miembros del orden *Chlamydiales* (Clase: *Chlamydiai*, Phylum: *Chlamydiae*), las Clamidias son bacterias gram-negativas intracelulares obligadas de células eucarióticas. Poseen ciclos de replicación característicos, con la alternancia de dos formas de diferenciación del microorganismo y comparten más del 80% de similitud en las secuencias de los ARNr de 16S y 23S. (Bergey, 2010).

Mediante la secuenciación del 16S ARNr, se demostró que existe una homología del 95% en las 4 especies de *Chlamydia* que están estrechamente relacionadas: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* y *C. pecorum*. (Baehr *et al.*, 1988).

La antigua clasificación se complicó considerablemente al reconocerse tres nuevos grupos de bacterias: las cepas "Z" o *Simkania*, *Parachlamydia* (Halls'coccus) y *Neochlamydia Waddlia*, éste última aislada de un feto bovino abortado, e inicialmente clasificado como *Rickettsia*.

En 1999, Everett *et al.* en base a la similitud de la secuencia de ARN ribosomal 16S y en el análisis de la longitud total de los ADNr 16S y 23S, propusieron la nueva clasificación del orden Chlamydiales, la cual considera además del análisis filogenético del operón ribosomal, las características fenotípicas, rango de huésped y las patologías asociadas. Estudios filogenéticos efectuados con posterioridad y en los que se han incluido otros cinco genes han validado esta nueva clasificación (Martínez *et al.*, 2001).

La nueva taxonomía de los Chlamydiales agrega dos nuevas familias no Chlamydiaceae e incluye así, cuatro familias: *Chlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Parachlamydiaceae* y *Waddliaceae*. De ésta forma, de acuerdo a la nueva taxonomía, las especies *Chlamydia trachomatis*, junto con las especies *Chlamydia suis* y *Chlamydia muridarum*, pertenecen al género *Chlamydia*, la familia *Chlamydiaceae* y el orden Chlamydiales mientras que las especies *C. pneumoniae* y *C. psittaci* pertenecen al nuevo género *Chlamydiophila*. Aunque mejor estructurada, ésta nueva taxonomía aun no es comúnmente aceptada por muchos clamidiólogos (Schachter *et al.*, 2001). (Fig. 2).



**Figura 2.** Taxonomía del orden Chlamydiales. Clasificación basada en las secuencias de los genes 16S y 23S ARN, Gen ompA, GroEL, KDO-transferasa y ompB. (Herring, 1993; Storz y Kaltenboek, 1993; Everett, 1999; Bush y Everett, 2001 y Bergey 2010)

## 1.7 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *CHLAMYDIA SP*

La pared celular de *Chlamydia* es similar a la de las bacterias gram negativas, se reproducen por fisión binaria y utilizan el ATP de la célula huésped para la síntesis de sus proteínas. Las especies de *Chlamydiaceae* son bacterias intracelulares obligadas de células eucarióticas con dos formas de vida distintas: el cuerpo elemental (CE) y el cuerpo reticular (CR).

Los CE son estructuras esféricas de tamaño pequeño, infecciosas, rígidas, resistentes a la ruptura debido a la presencia de puentes disulfuro de las proteínas de la capa externa de la membrana. Los CE se liberan cuando se destruye la célula huésped infectada, su tamaño oscila entre 200 y 400 nm, con la tinción de Giemsa se tiñen de púrpura y de color rojo cuando se contrastan con la técnica de tinción de Macchiavello, en contraste con la coloración que toma el citoplasma de la célula huésped (Mandell *et al.*, 2000).

En los CE, la mayor parte del ADN se encuentra en el nucleoide central electrodenso y la mayor parte del ARN está en los ribosomas. Presentan antígenos especie-específicos y antígenos serotipo-específicos que inducen la fagocitosis, no tienen actividad metabólica, no se pueden replicar, y son infectivos.

Los CR son el resultado de la diferenciación de los CE, desprovistos del nucleoide denso y de tamaño aproximado entre 600 a 1000 nm, metabólicamente activos y no infecciosos. Se tiñen de azul con el colorante de Giemsa, son capaces de replicarse y el ADN se encuentra disperso.

Las primeras descripciones ultraestructurales de cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* en tejidos humanos datan de 1975, cuando Swanson *et al.*, cotejaron las observaciones obtenidas con el microscopio óptico con las realizadas con el microscopio electrónico de transmisión en el tejido del cérvix uterino infectado por esa bacteria (Swanson *et al.*, 1975).

Posteriormente, partículas intracitoplásmicas de 200 a 300 nm de diámetro, de contenido electrodenso y membrana plasmática ondulante, se han descrito en el interior de las células epiteliales endocervicales descamadas, en los estereocilios de células epididimarias, en gotas residuales del espermatozoide, en tejido conectivo del testículo y en células de Leydig (De Borges y Carvallo, 1987; Villegas *et al.*, 1991).

## 1.8 SUB-FERTILIDAD DEL VARÓN E INFECCIÓN GENITO-URINARIA POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Se ha publicado que *Chlamydia trachomatis* es uno de los gérmenes presentes en los casos de infertilidad masculina y aunque no se conocen los mecanismos por los que este germen deteriora la fertilidad del hombre, se ha confirmado su capacidad de adherencia y penetración al citoplasma del espermatozoide (Wolner- Hanssen y Mardh, 1984; Erben, 1993).

En hombres asintomáticos e infértiles con leucocitospermia, está recomendado que se realicen estudios microbiológicos frecuentes. Los cultivos aeróbicos y anaeróbicos pueden detectar un amplio espectro de patógenos urogenitales, aunque determinados gérmenes sólo podrían identificarse mediante cultivos especiales (Paavonen y Eggert-Kruse, 1999). El espectro de microorganismos que pueden identificarse en cultivos seminales incluye desde especies no virulentas hasta gérmenes potencialmente patógenos. En el caso de los patógenos facultativos, la evidencia cuantitativa de su incremento, o la evidencia cualitativa clínica de su impacto sobre la salud reproductiva, permitirán evaluar si el tratamiento resulta conveniente (Schiefer, 1998). Dentro del grupo de microorganismos que son considerados obligadamente patógenos seminales se encuentran: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus ducreyi*, Herpes virus tipo I y II, Virus del Papiloma Humano y *Trichomonas vaginalis* (Schachter y Grossman, 2001). Otros autores han encontrado la presencia de *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma Genitalium* y enterobacterias como *Escherichia Coli* en el semen de varones infértiles, aunque sin una asociación clara con el desarrollo de piospermia (Kjaergaard *et al.*, 1997; Solis *et al.*, 2000).

En su estudio de 109 hombres infértiles, Swenson y O'Learly, en 1980, concluyeron que ninguna de las muestras seminales estudiadas era estéril, y que el aislamiento de *Chlamydia trachomatis* de la cavidad vaginal de mujeres adultas sanas sugiere que ha sido transportada a los conductos genitales adherida a los espermatozoides, lo que indica también la presencia de esta bacteria transferida por el semen a su pareja (Swenson y O'Learly, 1980).

Las infecciones genitourinarias del varón causadas por *Chlamydia trachomatis* y bacterias de la especie *Mycoplasma*, principalmente *Ureaplasma urealyticum*, son de particular importancia debido a su creciente frecuencia (Zvulonov *et al.*, 2000) y porque

provocan infecciones de tipo inespecífico que generalmente pasan inadvertidas (Trum *et al.*, 2000). De este modo, la infección se mantiene oculta por mucho tiempo y genera gradualmente una patología inflamatoria crónica de los órganos del aparato reproductor, lo que puede provocar infertilidad en el varón y otras secuelas patológicas en el testículo, en el epidídimo y/o en la vía espermática (Westrom, 1990; Greendale *et al.*, 1993; Chan y Schlegel, 2002).

En la mujer, gérmenes que anteriormente eran poco considerados como causa de infecciones genito-urinarias, como son *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, en la actualidad frecuentemente se aíslan en secreciones cérvico-vaginales de material endometrial procedentes de muestras de fluidos y tejidos obtenidos por histeroscopia y laparoscopia. Estos gérmenes se han asociado a obstrucción tubaria, hidrosálpinx y síndrome adherencial (Brunham *et al.*, 1985; Rosas *et al.*, 1993; Diquelou *et al.*, 1988; Taylor-Robinson, 2002).

### 1.9 ALTERACIONES SEMINOLÓGICAS POR *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

La asociación entre las infecciones del tracto genital en general y parámetros anormales del semen, tales como la azoospermia, la oligoastenozoospermia y los niveles elevados de anticuerpos anti-espermáticos, es aceptada desde hace más de una década por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1992). El diagnóstico y tratamiento de infecciones genitourinarias es esencial en la evaluación y manejo inicial de parejas que sufren de infertilidad. Sin embargo, una gran proporción de los hombres con infecciones genitourinarias son asintomáticos, lo que genera un conflicto para la definición de una infección clínicamente significativa.

En cuanto al hombre fértil o subfértil, varios autores han comentado que hay diferencias en el tipo y prevalencia de infección genitourinaria asociada, aunque el daño en la función del espermatozoide suele ser muy frecuentemente secundario a una epididimitis y a una próstato-vesiculitis crónicas (Keck *et al.*, 1998; Köhn *et al.*, 1998; Szöke *et al.*, 1998). En cambio, otros autores no han encontrado relación alguna entre la bacteriospermia y la disminución en la calidad del semen (Colpi *et al.*, 1989; Gregoriou *et al.*, 1988; Ness *et al.*, 1997). Con todo, la prevalencia de infección genital en hombres infértiles varía del 10 al 20% (WHO, 1992).

Con referencia a la importancia de las infecciones genitourinarias, por *Chlamydia trachomatis*, sobre la patología espermática y seminal subyacente al deterioro de la

fertilidad, durante las dos últimas décadas del siglo pasado los datos revelaban evidencias controversiales. Algunos reportes sugerían que las infecciones por *Chlamydia trachomatis* probablemente no contribuían a la infertilidad masculina (Gregorieu *et al.*, 1988; Ruijs *et al.*, 1990; Bjercke y Purvis, 1993; Eggert-Kruse *et al.*, 1996 y 1997; Habermann y Krause, 1999). No obstante, varios investigadores encontraron que las infecciones por *Chlamydia* estaban directamente relacionadas con la infertilidad del hombre (Diquelou *et al.*, 1989; Maciejewski *et al.*, 1989; Lombardo *et al.*, 1990; Wolff *et al.*, 1991; Erben, 1993; Greendale *et al.*, 1993; Samra *et al.*, 1994; Kadar *et al.*, 1995; Witkin *et al.*, 1995; Radouni *et al.*, 1996; Xiang y Chen, 1996; Yu *et al.*, 1998; Rezacova *et al.*, 1999). Otras publicaciones sugirieron que la bacteria es indirectamente productora de anticuerpos anti-espermatozoide y que por lo tanto evocaban una respuesta inmune contra los espermatozoides en las parejas de los hombres con infección seminal, y presencia de *Chlamydia trachomatis* en el exfoliado uretral (Soffer *et al.*, 1990; Witkin *et al.*, 1993). Hacia 1997, a fin de evaluar críticamente la posibilidad de que la *Chlamydia trachomatis* o la *Neisseria gonorrhoeae* causaran infertilidad en el hombre. Ness *et al.*, llevaron a cabo un metaanálisis de la literatura para evaluar cifras epidemiológicas para causalidad, plausibilidad biológica, fuerza de la asociación, dosis respuesta, consistencia, temporalidad y efecto del tratamiento; concluye que existe evidencia clínica que vincula éstos patógenos con la uretritis, que relacionan la uretritis con la epidídimo orquitis y la epidídimo orquitis con infertilidad. Los estudios epidemiológicos retrospectivos también apoyan la asociación entre la serología para *Chlamydia* y la infertilidad masculina, pero en la mayoría de estos estudios incluyen series pequeñas y no alcanzaron significación estadística.

Uno de los problemas en el estudio del impacto de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* en la fertilidad del hombre consiste en que en un porcentaje importante de casos las infecciones Chlamydiales se presentan en asociación con otros microorganismos (Creighton, 2003).

El significado de la leucocitospermia en muestras seminales es motivo de controversia, pero su presencia está considerada como un indicador de infección activa del tracto genital (WHO, 1992). Sin embargo, es importante destacar que existe una pobre correlación entre los diferentes métodos para la detección de leucocitos, incluyendo la identificación citológica, las técnicas de inmunocitoquímica, el marcaje con anticuerpos monoclonales, la medición de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la prueba de leucoperoxidasa (Aitken y Baker, 1995; Trum *et al.*, 1998). Muchos de estos

métodos de laboratorio son muy laboriosos y costosos, y pudieran no estar disponibles en forma rutinaria en muchos Laboratorios de Andrología. Además, las cifras de leucocitos de  $1 \times 10^6$  /ml, que se consideran como límite para el diagnóstico de leucocitospermia son valores empíricos (Aitken y Baker, 1995). Por tanto, el dato de la leucocitospermia, como un indicador de infección en hombres asintomáticos, tiene evidentes limitaciones. Cerca del 80% de las muestras con leucocitospermia son microbiológicamente negativas y en muchos hombres la leucocitospermia puede resolverse sin tratamiento (Yanushpolsky *et al.*, 1995).

En un estudio de 100 hombres con leucocitospermia (Wolf, 1995), el 54% de ellos tenían microbiología y serología completamente negativa, mientras que, aproximadamente el 25% de los hombres con leucocitospermia tenían anticuerpos anti-clamidia y casi la mitad de los que tenían semen sin leucocitospermia presentaban el mismo hallazgo. Así mismo, otros gérmenes patógenos incluyendo *Ureaplasma urealyticum*, *Proteus mirabilis*, *Mycoplasma hominis*, *Escherichia coli* y *Enterococcus spp.* se detectan con la misma frecuencia en hombres leucocitospérmicos y no leucocitospérmicos (Trum *et al.*, 1998; Chan y Schlegel, 2002).

Varios estudios han propuesto el uso de marcadores físicos y bioquímicos para ayudar al diagnóstico de inflamación del tracto reproductor masculino o para diferenciar la infección bacteriana de la contaminación del espécimen. Estos marcadores incluyen la determinación del magnesio, del fosfato inorgánico (Adamopoulos y Deliyannis, 1983), del ácido cítrico (Comhaire *et al.*, 1989), de la interleucina IL 6 (Zalata *et al.*, 1995; Depuydt *et al.*, 1996) y de la interleucina IL 8 (Koumantakis *et al.*, 1998).

Muchos estudios han evaluado el efecto de la bacteriospermia sobre la tasa de éxito de la fertilización *in vitro* y han concluido que no existe un efecto adverso y que la terapia antibiótica es innecesaria (Claman *et al.*, 1996; Liveversedge *et al.*, 1996; Stovall *et al.*, 1993). Se ha considerado que el lavado espermático rutinario durante la preparación para fertilización *in vitro* puede remover las bacterias y que la presencia de antibióticos en los medios de cultivo, puede ulteriormente erradicar las bacterias extraídas por el lavado (Cottell *et al.*, 1997). Aunque se reconoce que la vaginosis y el antecedente de infección clamidial están asociados a infertilidad, se ha negado que esto afecte las tasas de éxito en reproducción asistida (Gaudoin *et al.*, 1999).

Contrariamente, de acuerdo a otras publicaciones, las infecciones genitales han sido reconocidas como causa de fracaso en técnicas de reproducción asistida, (Licciardi *et al.*, 1992), siendo cada vez más amplio el consenso acerca de su diagnóstico y tratamiento específico precoz como medida que mejora las tasas de éxito en la fecundación *in vitro* y la implantación embrionaria (Levy *et al.*, 1999; Sharara y Queenan, 1999; CDC, 2000).

La relación de las infecciones genitourinarias con otras condiciones que, como el varicocele, se asocian causalmente con gran frecuencia a infertilidad primaria o secundaria en el varón, ha sido motivo de controversia (Gattuccio *et al.*, 1988). No obstante, se ha demostrado en el varicocele que la *rete testis* puede sufrir una dilatación quística cuando se lesiona la cabeza del epidídimo, ya sea en forma directa por el proceso inflamatorio o indirectamente como una secuela cicatricial obstructiva; en ambas situaciones existe un deterioro de la concentración y calidad del espermatozoide (Nistal *et al.*, 1998). En el momento actual, es necesario disponer de datos concretos y evidencias consistentes que demuestren la influencia negativa de las infecciones subclínicas y la inflamación sobre el estatus de fertilidad del varón, así como su asociación con otros factores causantes de infertilidad o sub-fertilidad masculina (Weidner *et al.*, 1998; Diemer *et al.*, 2000).

#### **1.10 MECANISMOS DEL DAÑO A LOS ESPERMATOZOIDES EN PACIENTES CON INFECCIONES GENITO-URINARIAS**

*Chlamydia trachomatis* en combinación con *Ureaplasma urealyticum* se ha encontrado en un elevado número de casos de pacientes infértiles de la región noreste de México, en los que la causa de la falla reproductiva no se logró establecer con los protocolos convencionales de abordaje diagnóstico para la infertilidad (Gallegos-Ávila, 2005). Existiendo evidencia contradictoria acerca de la importancia de la presencia de estos gérmenes en el líquido seminal y de su rol en la infertilidad masculina, la microscopía electrónica ha sido de gran utilidad en el estudio de los mecanismos celulares subyacentes a ésta condición. Esto es particularmente evidente cuando consideramos que por su tamaño, *Chlamydia*s y sobre todo *Mycoplasmas*, se encuentran muy cerca del límite resolutivo del microscopio de luz.

Mediante estudios de ultraestructura se ha detectado *Chlamydia trachomatis* en los espermatozoides del semen de pacientes infértiles, habiéndose descrito cuerpos elementales adheridos en pieza intermedia, cuello, cabeza y citoplasma espermático



(Wolner-Hanssen y Mardh, 1984; Erbengi, 1993; Bragina *et al.*, 2001; Gallegos-Ávila, 2005).

Erbengi (1993) presentó evidencias no sólo de la presencia de cuerpos elementales de *Chlamydia* adheridos al espermatozoide, sino también de la internalización de la bacteria al flagelo, acrosoma y núcleo de espermatozoide, mediante un mecanismo de endocitosis, sin la participación de fagosomas o lisosomas. Este mismo autor describió también cómo la membrana plasmática de la *Chlamydia trachomatis* se fusiona a la del espermatozoide, formándose así una nueva membrana y la ulterior multiplicación del germen; de este modo se forman los cuerpos reticulares (Erbengi, 1993).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo condiciones inflamatorias del tracto genital pueden conducir a infertilidad en el varón. Muchas de estas nociones, sin embargo, aún son especulativas y motivo de debate (Eggert-Kruse *et al.*, 1998; Michelmann, 1998; Wolff, 1998; Hales *et al.*, 1999).

En las infecciones genitourinarias, los mecanismos implicados en la lesión espermática que interfieren con la capacidad fecundante del espermatozoide, se encuentran: el daño de las membranas de los espermatozoides ocasionado por radicales libres de oxígeno (Ochsendorf *et al.*, 1999; Alvarez y Storey, 2001; Agarwal y Saleh, 2002), y la presencia de los anticuerpos anti-espermatozoide (Eggert-Kruse *et al.*, 1998; Ochsendorf *et al.*, 1999; Dondero *et al.*, 1998). También se ha encontrado que las infecciones por *Chlamydia trachomatis* pueden aumentar la proporción de fragmentación de DNA y alterar la capacidad de reacción acrosómica (Cunningham y Beagley, 2008).

Otro mecanismo de lesión puede ser el efecto de las bacterias sobre la motilidad de los espermatozoides, ya que se ha demostrado que *Escherichia coli* tiene un significativo efecto negativo sobre la motilidad de los espermatozoides (Diemer *et al.*, 1996; Huwe *et al.*, 1998). Sin embargo, en algunos de estos estudios, el título de bacterias es mucho más grande que el encontrado *in vivo*. De hecho, tal efecto sobre la motilidad de los espermatozoides no ha sido encontrado para otros patógenos como *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* (Huwe *et al.*, 1998; Köhn *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la adhesión de *Chlamydia trachomatis* al espermatozoide puede afectar su movilidad, provocando astenozoospermia en la mayoría de los pacientes estudiados (Diquelou *et al.*, 1989).

Existen evidencias que sugieren un daño del espermatozoide producido directamente por los leucocitos (Zalata *et al.*, 1998); Se ha demostrado que productos de los leucocitos como las linfocinas, monocinas y ROS reducen la capacidad fertilizante del espermatozoide (Hill *et al.*, 1989; Henkel y Schill, 1998). La leucocitospermia se ha asociado con morfología anormal de los espermatozoides, incluyendo cabezas pequeñas y elongadas, anormalidades del cuello y cola, retención de la gota citoplásmica y morfología anormal del acrosoma (Menkveld y Kruger, 1998). La leucocitospermia también puede afectar la hiperactivación de los espermatozoides durante su capacitación (Chan *et al.*, 1994).

Las infecciones genitales pueden afectar a la función secretora de vesículas seminales y de la próstata, y pueden disminuir la secreción de alfa-glucosidasa del epidídimo (Depuydt *et al.*, 1996), la cual se ha visto que tiene un efecto positivo sobre la capacidad de fijación de los espermatozoides y la inseminación intrauterina (Ben Alí *et al.*, 1994; Milingos *et al.*, 1996).

En algunos casos, *Chlamydia trachomatis* puede desencadenar una reacción inflamatoria que puede facilitar la formación de anticuerpos anti-espermatozoides (Hargreave *et al.*, 1984; Micic *et al.*, 1990) o afectar a órganos como la próstata, cuya reacción inflamatoria puede extenderse a toda la vía seminal (Gattuccio *et al.*, 1988).

La producción de anticuerpos anti-espermáticos de reactividad cruzada entre ciertos epítopes sobre la superficie bacteriana y el espermatozoide, principalmente determinantes de tipo carbohidrato (Kurpisz y Alexander, 1995), ha sido involucrada en los mecanismos que afectan a la capacidad fertilizante del espermatozoide (Clarke *et al.*, 1985; Hinting *et al.*, 1996). Por el contrario, Habermann y Krause, en 1999, encontraron que la alteración de las funciones de espermatozoides en pacientes con leucocitospermia no siempre se relacionó con la presencia de anticuerpos anti-*Chlamydia* y la respuesta inmune frente a los espermatozoides. Munuce *et al.*, en 1999, no encontraron relación alguna entre la presencia de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*, con alteraciones en el líquido seminal, concretamente con la hiperviscosidad del semen, la presencia de leucocitos y la demostración de anticuerpos anti-espermatozoides.

Recientemente, se han publicado avances en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan las funciones del espermatozoide (Aitken, 1997). Se sabe que las especies reactivas de oxígeno causan peroxidación lipídica y disminución de la fluidez de

la membrana plasmática del espermatozoide, con disminución de la motilidad y de la reacción acrosomal (Aitken y Baker, 1995; Potts *et al.*, 2000), y que bacterias de la especie *Mycoplasma* son productoras principalmente de ROS, particularmente del ión superóxido y del peróxido de hidrógeno (Vicari, 1999). Se ha demostrado que algunas bacterias, incluyendo *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* y *Escherichia coli*, tienen un efecto negativo sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano *in vitro*, inducida por ionóforos (Rose y Scott, 1994; El-Mulla *et al.*, 1996; Köhn *et al.*, 1998), además de interferir en la motilidad y condensación del DNA (Ochsendorf, 2008).

La membrana plasmática de las células germinales de mamíferos contiene un receptor para *Ureaplasma Urealyticum* consistente en un derivado sulfogalactoglicerolipídico que se encuentra ubicado predominantemente en la cabeza del espermatozoide, y que también está implicado en la fusión de las membranas del espermatozoide y del óvulo durante la fecundación (Law *et al.*, 1988).

*Ureaplasma urealyticum* se adhiere al espermatozoide y pudiera alterar sus funciones celulares por daños estructurales o metabólicos. Por su contenido de ureasa, el *Ureaplasma urealyticum* puede alterar el pH local, actuando como toxina; en este sentido, en bovinos se ha demostrado una afectación del movimiento de los cilios del epitelio del oviducto por efecto *in vitro* de la infección por *Ureaplasma urealyticum* (Stalheim *et al.*, 1976).

El *U. urealyticum* también posee en su membrana actividad de fosfolipasa (De Silva y Quinn, 1991) y una aril-sulfatasa. Esta última enzima, en los casos de infección por el *Mycoplasma pneumoniae*, degrada al receptor sulfogalactoglicerolipídico una vez que se une a la membrana, pudiendo interferir así con la fecundación (Lingwood *et al.*, 1990).

Las interacciones entre el *Mycoplasma* y la membrana del espermatozoide pudieran dejar expuestos al sistema inmune antígenos del espermatozoide, con la producción secundaria de anticuerpos anti-espermatozoide, lo cual también se ha relacionado con la infertilidad del varón (Soffer *et al.*, 1990).

## 1.11 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE *CHLAMYDIA*

Los métodos que se aplican al diagnóstico de *C. trachomatis* comprenden: inoculación de cultivos celulares, pruebas directas para la detección de antígenos, pruebas de fijación de complemento, métodos de hibridación de ácidos nucleicos y técnicas de

amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, por sus siglas en inglés). Estos procedimientos tienen distintos requerimientos de toma y transporte de muestras, en relación con las características de las técnicas a utilizar.

### 1.11.1 *Cultivo en Líneas Celulares*

Hacia 1970, se implementó el cultivo de *Chlamydia trachomatis* en líneas celulares, siendo el procedimiento que presenta una mayor especificidad para el diagnóstico de Clamidia que llega al 100% y es considerado como *Estándar de Oro*. No obstante, por su baja sensibilidad, por su complejidad y los requerimientos de una cadena de frío para el mantenimiento de la viabilidad que implica restricciones en la recogida de muestras, transporte y almacenaje del espécimen, no es recomendada como técnica de diagnóstico rutinario.

Las células que se han utilizado para los cultivos de *Chlamydia* son: células de McCoy, monocapa de fibroblastos de ratón (Stamm *et al.*, 1983); células HeLa 229, de carcinoma epidermoide del cuello uterino (Kuo *et al.*, 1972); y células VERO, células de riñón de mono verde (Krech *et al.*, 1989). Las células HeLa 229 al ser tratadas con detergentes iónicos como el DEAE-Dextran (dietilaminoetil-dextrán), presentan un aumento de su susceptibilidad a la infección (Rota y Nichols, 1971; Kuo *et al.*, 1972).

El cultivo en líneas celulares *Hela* 229 y McCoy para el aislamiento de *C. trachomatis*, requiere de previa centrifugación del inóculo (1700g) y la adición de cicloheximida al medio de cultivo para inhibir el metabolismo de la célula huésped, y aumentar la recuperación de microorganismos viables. Para la detección de las inclusiones en los cultivos inoculados se utilizan anticuerpos monoclonales específicos conjugados con fluoresceína. Las tinciones con Giemsa permiten ver las inclusiones en un microscopio de campo claro de una forma sencilla y barata, pero con falsos positivos para observadores poco expertos.

### 1.11.2 *Detección Directa del Antígeno*

En la década de los ochenta se desarrollaron técnicas de detección de antígeno y ácidos nucleicos, siendo su empleo cada vez más frecuente por su bajo costo y por la facilidad metodológica para su evaluación (Schoenwald *et al.*, 1988).

La primera prueba fue el ensayo de inmunofluorescencia directa (DFA) utilizando fluoresceína unida al anticuerpo monoclonal para permitir la localización de los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* para ser visualizados microscópicamente en extensiones de secreciones tomadas del endocervix y de la conjuntiva (Microtrack, Trinity Biotech, Ireland) (Thomas *et al.*, 1984).

A excepción de los métodos de diagnóstico molecular, las técnicas diagnósticas para *Chlamydia trachomatis* se basan en la visualización del microorganismo por tinciones con anticuerpos específicos marcados con fluoresceína, anticuerpo fluorescente directo (DFA), detección inmunocitoquímica del antígeno en el inmunoensayo (EIA) y la detección con sonda específica de hibridación del ADN clamidial (Watson *et al.*, 2002). Ambos ensayos generan resultados más o menos rápido (dos a tres horas) cuando se comparan con el cultivo de *Chlamydia trachomatis* (3 a 7 días), pero tienen una sensibilidad ligeramente menor. Una limitación de la DFA es el requerimiento de microscopistas expertos, que su realización es laboriosa y por lo tanto menos adecuada para estudios amplios o aplicación poblacional, comparándola con la EIA.

La técnica de DFA sigue siendo uno de los métodos comúnmente utilizados para el diagnóstico de *Chlamydia spp.* debido a que presenta una buena sensibilidad y especificidad. Su sensibilidad es del 80 al 90% y debido a la utilización de anticuerpos monoclonales específicos presenta una alta especificidad, del 98 al 99%. La técnica DFA es muy valiosa ya que permite la visualización de los cuerpos elementales dentro de las células epiteliales, lo que es favorecido por las propiedades tintoriales de la *Chlamydia* y su característica morfología. Esta técnica es además muy práctica, porque su tiempo de realización es inferior a 30 minutos y no requiere de cultivo ni de medios especiales de transporte o refrigeración de la muestra para su traslado al laboratorio (Moller, 1982, Chernesky *et al.*, 1986; Quinn *et al.*, 1987).

La técnica de DFA ha sido aplicada al diagnóstico de *Chlamydia* en muestras obtenidas de conjuntiva (Gordon, 1969; Bell *et al.*, 1984), recto (Stamm *et al.*, 1983), uretra (Stamm *et al.*, 1984), y endocervix (Tam *et al.*, 1984; Linder *et al.*, 1986). También existen publicaciones de la aplicación de ésta técnica en el líquido seminal (Kojima *et al.*, 1987). De acuerdo a los estudios de Chernesky *et al.*, la sensibilidad de la técnica DFA en muestras uretrales (alrededor del 70%) es un poco menor que en otros tipos de muestra, hecho que aún permanece inexplicado (Chernesky *et al.*, 1986). La aplicación de la prueba de DFA en el sedimento urinario de hombres se recomienda únicamente como prueba

confirmatoria del diagnóstico, ya que su sensibilidad en estas muestras no es muy alta (Stary *et al.*, 1992).

La eficiencia diagnóstica de la técnica de DFA requiere de un entrenamiento específico en la evaluación microscópica, de la utilización de un método de fijación adecuado, de la selección cuidadosa del serotipo del antígeno y el tipo de anticuerpo utilizado (Woods y Bryan, 1994). La presencia de más de 10 cuerpos elementales es un requisito para considerar positiva la prueba, aunque algunos laboratorios consideran positiva una prueba cuando se observan menos de 10 cuerpos elementales o tienen que centrifugar la muestra para aumentar la oportunidad de hallazgo de cuerpos elementales (Pothier y Kazmierczak, 1987; Thomas *et al.*, 1991).

La DFA es una técnica de diagnóstico rápida, pero precisa de la cuidadosa y experta observación microscópica y por ello no es adecuada para el procesamiento continuo de un gran número de muestras clínicas. En los países desarrollados donde el personal cualificado es caro, se utilizan preferentemente las técnicas de mayor automatización como EIA y las técnicas moleculares.

La DFA se basa en el empleo de anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína principal de la membrana externa de *C. trachomatis*, *Omp1*, o al lipopolisacárido (LPS), o contienen una mezcla de los dos anticuerpos. La calidad de la tinción de los ensayos de DFA que contienen anticuerpos monoclonales con especificidad por el LPS es inferior, ya que la tinción de los CE se ve difuminada. Pero, además, algunos anticuerpos dirigidos al LPS, reconocen el LPS de otras bacterias gram-negativas, por lo que sólo se recomienda el empleo de anticuerpos monoclonales anti *Omp1* (Forbes *et al.*, 1986; Sachse *et al.*, 2009).

Una de las ventajas de la DFA es que nos permite evaluar la calidad de la muestra debido al contenido celular. Una muestra inadecuada no contiene células epiteliales columnares ni de células escamosas. La sensibilidad de la DFA, en comparación con el cultivo celular, varía entre 80 y 90%, mientras que la especificidad fluctúa entre 94 y 99%. Los valores más altos de sensibilidad son observados en poblaciones con alta prevalencia de infección por clamidias y en población sintomática.

En comparaciones hechas en poblaciones con baja prevalencia de infección y en personas asintomáticas, se ha demostrado un escaso número de CE por preparado citológico inferior a 10, lo que reduciría la sensibilidad de la técnica (Schachter, 1985; Forbes, 1986).

Pruebas más recientes y sofisticadas han incluido métodos como la PCR o la reacción en cadena de la ligasa y las pruebas de inmunoabsorción para la detección de anticuerpos anti-lipopolisacárido-clamidia (Dille *et al.*, 1993, Palayekar *et al.*, 2000).

### 1.11.3 *Enzimoimmunoanálisis.*

El segundo método inmunoquímico de detección para *Chlamydia trachomatis* fue un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima en fase sólida, usando anticuerpos policlonales anti-clamidia para capturar el antígeno de *Chlamydia trachomatis* sobre esferas (Chlamydiazyme Abbott Laboratories, USA) (Pothier y Kazmierczak, 1986).

Actualmente, los enzimo-inmunoanálisis incluyen una gran variedad de formatos como son los ensayos clásicos en microplaca, los ensayos automatizados y las pruebas rápidas. Todos ellos emplean anticuerpos mono o policlonales frente a lipopolisacáridos. Por ser rápidos y automatizados, permiten procesar un número grande de muestras y eliminan la subjetividad del observador. Sin embargo la detección de antígeno de *C. trachomatis* por ésta técnica, aún con el empleo de anticuerpos específicos, ha mostrado una pobre sensibilidad (Sachse, 2009).

El inmunoensayo indirecto está basado en el principio “sándwich”, por el cual se detecta la presencia en el suero de anticuerpos específicos dirigidos contra un antígeno que está fijado en una fase sólida (portaobjetos de vidrio, plástico o una membrana de celulosa), y al que se unen tras un periodo de incubación formando complejos antígeno anticuerpo. Posteriormente, tras un lavado para retirar los anticuerpos que no se hayan unido, se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina humana marcados con un fluorocromo que nos permitirán detectar por microscopía los complejos que se hayan formado en la primera fase.

Los EIA clásicos como Chlamydiazyme® (Abbott, USA), Microtrak® (Syva, E.U.A.) y CHLAMYDIA DIRECT IF® (BioMerieux, Francia) incluyen un reactivo de confirmación de las muestras positivas y su especificidad varía actualmente entre 98 y 100%, en comparación con el cultivo celular. En contraste, la sensibilidad de los EIA es inferior a la del cultivo.

Newhall *et al.*, en 1999, compararon en un estudio multicéntrico, varios procedimientos de diagnóstico inmunológico en el formato de EIA e IFD para la evaluación de 4980 muestras cervicales en una población con baja prevalencia de

infección. Mientras la especificidad de los procedimientos, luego de efectuar ensayo confirmatorio, varió entre 99,6 y 99,8%, las sensibilidades de las técnicas fluctuaron entre 61,9 y 74,5%. La IFD (Microtrak®, Syva) fue la técnica más sensible. Entre las técnicas de EIA, EIA Syva fue la más sensible, 70,6%, mientras que EIA Sanofi y EIA Abbott tuvieron valores de sensibilidad de 61,6 y 61,9% respectivamente.

Como prueba rápida, los EIA han sido diseñados para emplearse en la consulta de atención primaria como apoyo al diagnóstico clínico y son buenas herramientas para detección a nivel de consulta primaria (Martínez, 2009). Al proporcionar resultados inmediatos, estas técnicas permiten indicar tratamientos inmediatos disminuyendo la pérdida de pacientes. Sin embargo, su especificidad es inferior a la de las técnicas convencionales y dado que la prevalencia en laboratorios de atención primaria es baja o moderada, tienen bajo valor predictivo positivo (Swain, 2004).

#### **1.11.4 Fijación del Complemento**

Esta técnica detecta anticuerpos específicos de género, dirigidos contra el LPS, el cual es responsable de la reacción específica de género y por lo tanto puede dar lugar a reacciones cruzadas entre especies de *Chlamydia* o *Chlamydophila*, por lo que ésta técnica no es útil para el diagnóstico de reinfecciones al no distinguir entre infección aguda e infección persistente.

Es necesario la presencia de un nivel mínimo de anticuerpos o una seroconversión para establecer un diagnóstico serológico de infección, así como la detección de las tres clases de anticuerpos IgG, IgM e IgA si queremos distinguir entre las distintas presentaciones de infección; aguda, reinfección o reactivación, infección crónica o persistente e infección antigua (Eikman, 1993).

La utilidad de las pruebas serológicas con fines diagnósticos ha sido reconocida por algunos autores como método adecuado en mujeres con patología tubaria, lo cual permitiría evitar procedimientos quirúrgicos. Sin embargo la aplicación diagnóstica para infecciones ginecológicas iniciales y superficiales no ha sido valorada (Schoenwald, *et al.*, 1988).



### 1.11.5 Hibridación con Sondas de DNA

Actualmente está disponible otro método de detección directa considerado como el *point of care* (POC) de las pruebas rápidas, las pruebas con sondas de DNA y los altamente sensitivos test de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT). Los tres ensayos POC más comúnmente usados son el Clearview® (Uniptah, UK), Biostar® (Thermo electron corporation, USA) y el Quick View® (Quidel, USA), todos ellos se basan en la detección del antígenos directo de *Chlamydia trachomatis*. Los test POC dan un resultado en 30-40 minutos, asegurando que el paciente recibe inmediatamente el tratamiento antibiótico necesario. Al igual que las pruebas rápidas para Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), los ensayos POC son de una alta especificidad, pero de una baja a moderada sensibilidad, estando por lo tanto, indicada una segunda prueba de mayor sensibilidad para confirmar el resultado obtenido. La utilidad mayor de las pruebas POC está en los casos en los que fuera poco probable que el paciente regrese por el tratamiento y así como en los programas de rastreo poblacional (Mahilum-Tapay *et al.*, 2007; Sabido *et al.*, 2009). Las dos pruebas con sondas de DNA más usadas son el PACE2 (Gen-Probe INC, USA) y la HC2: prueba de *Chlamydia trachomatis* con captura de Híbridos 2 (Quiagen, USA) (Modarres *et al.*, 1999; Van Der *et al.*, 2002). El sistema PACE2 utiliza una sonda de ADN marcada que se une al ARNr de la *Chlamydia trachomatis*, generando un híbrido ADN/ARN. No se requiere amplificación, debido al alto número de copias de ARNr de *Chlamydia trachomatis*. Aunque ésta prueba tiene una muy buena especificidad, ha venido siendo sustituida por la más económica y sensible HC2. El blanco de la HC2 son tanto la secuencia de bases del gen *OmpA* como el ADN del plásmido endógeno mediante una sonda de ARN marcada. La HC2 no requiere amplificación del ADN debido a que utiliza una señal de amplificación con múltiples anticuerpos marcados específicos para los híbridos ADN/ARN. El uso de una señal de amplificación en lugar de la amplificación del ADN evita el riesgo de contaminación. El uso de HC2 es una buena alternativa para los NAAT, aunque la sensibilidad de las pruebas con sondas de ADN es ligeramente menor (Black *et al.*, 2002).

### 1.11.6 Amplificación de Ácidos Nucleicos

Las técnicas de biología molecular son utilizadas para la detección directa de los microorganismos difíciles de cultivar o detectar como la *C. trachomatis*. Se han empleado

ensayos de hibridación con sondas marcadas, pero la sensibilidad es baja y su costo es muy elevado. La técnica más utilizada es la amplificación de los ácidos nucleicos.

Las NAAT son en general la mejor herramienta diagnóstica para la detección de *Chlamydia trachomatis*, aunque son relativamente costosas (CDC, 2009). A pesar de esto, las pruebas NAAT son hoy en día el estándar de oro para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*. Diferentes tipos de NAAT están disponibles comercialmente como la prueba Optima Combo 2 basada en ARNr (Gen-probe), la prueba COBAS Aplicor® (Roche, Diagnostic); el COBAS Taq man® (Roche Diagnostic) y el Ct-DT DEIA® (Lab Biomedical Products BV), son usadas para diagnóstico de rutina. La mayoría de las pruebas tienen diferentes blancos (por ejemplo el plásmido endógeno, el DNA cromosomal o el ARNr), pero en general tienen la misma sensibilidad.

Los NAAT son los procedimientos de elección para el diagnóstico de *C. trachomatis* en virtud de su sensibilidad y especificidad y porque no requieren de la toma de muestras invasoras para su ejecución. Se ha demostrado que las NAAT detectan entre 17 y 28% más infecciones que otros procedimientos de diagnóstico (Martínez, 2009).

Existen varias tecnologías comerciales de NAAT, siendo los más conocidos la PCR, la reacción en cadena de la ligasa y la amplificación por desplazamiento de hebra. Se han presentado en algunos kits diagnósticos que detectan simultáneamente a *C. trachomatis* y *N. gonorrhoeae*. No obstante estos procedimientos cuando se trabajan con valores predictivos positivos menores del 90% pueden generar resultados falsos positivos (CDC, 2006).

#### **1.11.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR**

La PCR detecta microorganismos que han dejado de ser viables durante el transporte, y permite además detectar microorganismos no cultivables durante una infección persistente. Se han utilizado varios oligonucleótidos específicos de la secuencia genómica de *C. trachomatis* tanto en la amplificación simple como en la reamplificación. Las dianas genómicas empleadas incluyen secuencias del ARN ribosómico 16S, el gen *omp1* del complejo MOMP, el gen de la MOMP de 60 kDa, rica en cisteína y secuencias codificadas de función desconocidas. La PCR tiene una alta especificidad respecto al cultivo y una sensibilidad que oscila en torno al 99,8%.

La detección positiva sin que exista infección activa es uno de los inconvenientes de la técnica. Esto puede afectar a la especificidad diagnóstica de la técnica al dar valor diagnóstico a un hallazgo que no lo tiene. La detección positiva en muestras, sin respuesta clínica acompañante, puede indicar sólo colonización, o bien, infección crónica en lugar de ser la causa primaria del cuadro clínico presente. En las infecciones más superficiales, como es el caso de la uretritis o proctitis, puede faltar la detección de anticuerpos contra *C. trachomatis* y ser positivo el aislamiento de la bacteria.

La técnica PCR tampoco puede distinguir organismos muertos de organismos vivos después de un tratamiento antibiótico, pero la detección de ARN mensajero, mediante la técnica de la transcriptasa inversa PCR indicaría actividad metabólica (Khan *et al.*, 1996).

En infecciones uretrales, comúnmente producidas por *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*, se puede encontrar copias de DNA remanente presentes en la orina que pueden ser amplificadas por PCR. Esta aplicación de pruebas moleculares en orina favorece el estudio de poblaciones asintomáticas sin utilizar métodos de toma de muestra invasivos y molestos para el paciente (Morré *et al.*, 1998). La técnica de PCR es un procedimiento complejo, costoso y cuando no se estandariza en los laboratorios se dificulta su empleo para el diagnóstico a gran escala. Además la PCR puede dar falsos negativos por la presencia de inhibidores de la amplificación como moco y sangre y de *ADNasas* en la muestra (Rivero, 2001).

## **1.12 ESTUDIOS CITOMORFOLÓGICOS EN INFECCIONES GENITALES POR *CHLAMYDIA***

En general, *Chlamydia trachomatis* no puede observarse con tinción de Gram debido a que carece de la capa de peptidoglicano con ácido murámico, sin embargo, las Clamidias forman inclusiones intracelulares características que permiten su identificación por microscopía de luz de campo claro o por microscopía de fluorescencia (Schachter, 1990; Schachter y Grossman, 2001).

La utilidad de estudios citomorfológicos para el diagnóstico de infecciones genitales por *Chlamydia*, es conocida desde 1970. Antes del uso del examen con inmunofluorescencia directa para la visualización de *Chlamydia*, los estudios citológicos con técnicas sencillas, como la tinción de Papanicolaou y la de Giemsa, se aplicaron exitosamente a secreciones y exfoliados celulares de mucosas de revestimiento para la detección de *Chlamydia* (Naib, 1970). Este tipo de diagnóstico se aplicó eficazmente por

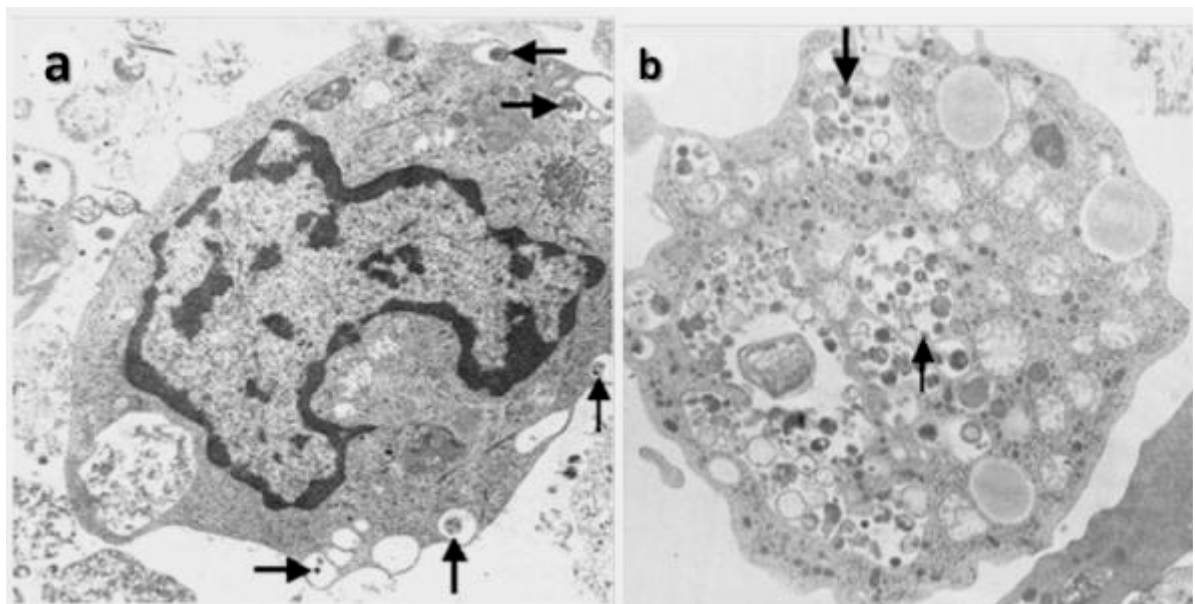
mucho tiempo al estudio de exudado del cuello uterino en las cervicitis mucopurulentas (Moller, 1982; Hernández *et al.*, 1992) y más recientemente en casos de conjuntivitis neonatal (Schachter y Grossman, 2001). A pesar de ello, con el tiempo, las mejoras tecnológicas han conducido erróneamente, en nuestra opinión, a subestimar el diagnóstico basado en las características morfológicas de los gérmenes, por considerarlas inespecíficas, o más probablemente, por falta de experiencia en la minuciosa valoración que exigen los estudios citomorfológicos.

La aplicación de técnicas de microscopía electrónica al estudio de tejidos y de las secreciones genitales del varón y de la mujer con infección genito-urinaria, ha permitido confirmar la presencia de *Chlamydia* y su asociación física con las células infectadas (Swanson *et al.*, 1975; Wolner-Hanssen y Mardh, 1984; De Borges y Carvalho, 1987; Villegas *et al.*, 1989 y 1991; Erbeni, 1993; Gallegos *et al.*, 1996 y 1998; Bragina *et al.*, 2001). Además, esta tecnología submicroscópica ha sido históricamente y sigue siendo en la actualidad de gran importancia, no solo en los estudios de alteraciones morfológicas de los espermatozoides asociadas a la infertilidad masculina (Zamboni, 1987; Afzelius *et al.*, 1995; Chemes *et al.*, 1998 y 1999; Szczygiel y Kurpisz, 1999), sino también en estudios acerca de problemas de infecciones seminales vinculadas a la disminución de la capacidad fértil del hombre y en particular con el diagnóstico exacto de microorganismos de los géneros *Chlamydia* y *Mycoplasma* (Villegas *et al.*, 1989 y 1991; Núñez-Calonge *et al.*, 1998; Gallegos y Ramírez, 1998; Díaz y Gallegos, 1999; Bragina *et al.*, 2001), en los cuales se han descrito e ilustrado el fenómeno de fagocitosis espermática por células inflamatorias y la observación de espermatozoides infectados por partículas bacterianas con las características que corresponden a los géneros de *Chlamydia* y *Ureaplasma* (Gallegos *et al.*, 2009 y 2010).

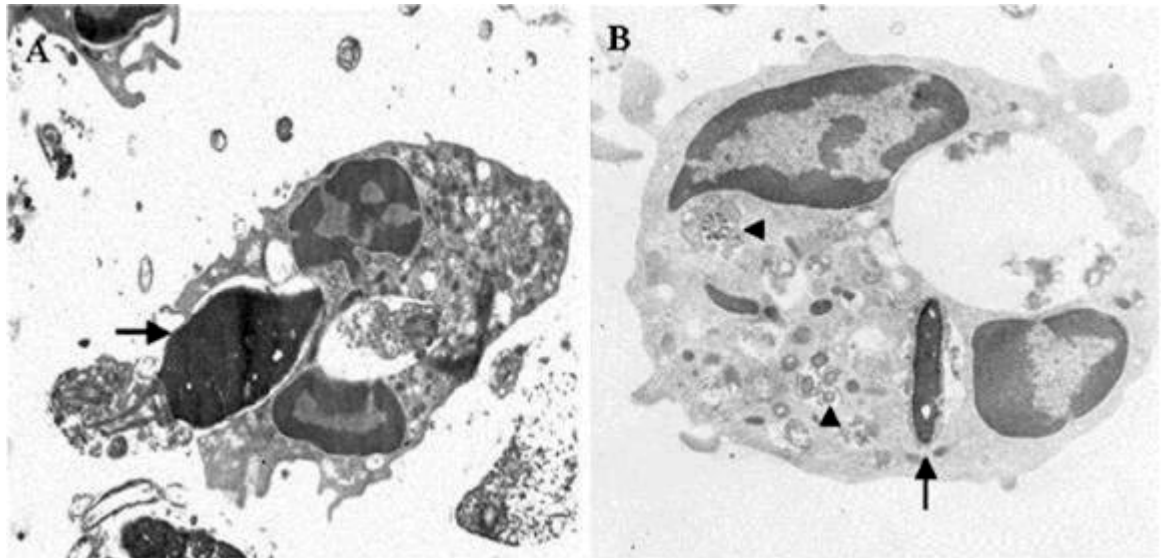
En publicaciones previas, nuestro grupo ha señalado la importancia de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* y su relación con la fragmentación del ADN espermático en los problemas de infertilidad y aborto; en población del noreste de México (Gallegos *et al.*, 2008). Para el diagnóstico de las infecciones por *Chlamydia trachomatis* hemos complementado el cultivo en medios selectivos para *Mycoplasmas* y la inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales contra *Chlamydia trachomatis* con técnicas citomorfológicas llevadas a cabo en preparaciones del líquido seminal, tanto en fresco como en material fijado. Además del estudio de la morfología espermática, por el método convencional de Papanicolaou, hemos analizado los cambios de ultraestructura

espermática y características de las células de inflamación asociadas a esas infecciones (Gallegos *et al.*, 2009a; Gallegos *et al.*, 2009 b; Gallegos *et al.*, 2009 c; Gallegos *et al.*, 2010).

En nuestros estudios citomorfológicos del líquido seminal, se confirmó la presencia de alteraciones que resultaron características de los pacientes subfértiles con infección genitourinaria (IGU), cuando se comparó con un grupo control de voluntarios fértiles sin IGU ( $p \leq 0,00001$ ). Tanto en cortes semifinos como en los ultrafinos, se demostró la presencia de *Mycoplasma* y *Chlamydia* y su incorporación a los espermatozoides así como el desarrollo de una respuesta inflamatoria caracterizada por la fagocitosis de bacterias, de espermatozoides y de células germinales inmaduras; es así que en diversas publicaciones hemos descrito la presencia de bacterias, células fagocíticas, células epiteliales exfoliadas de la vía seminífera, restos citoplásmicos, detritus celulares, células germinales inmaduras e infectadas y espermatozoides con diferentes alteraciones. Las partículas bacterianas correspondientes a *C. trachomatis* y *Mycoplasma spp.* se observaron libres en el espacio extracelular, adheridas y dentro de las células inflamatorias, de las células epiteliales, de los espermatozoides y de las células inmaduras de la línea germinal. (Figs. 3-6).



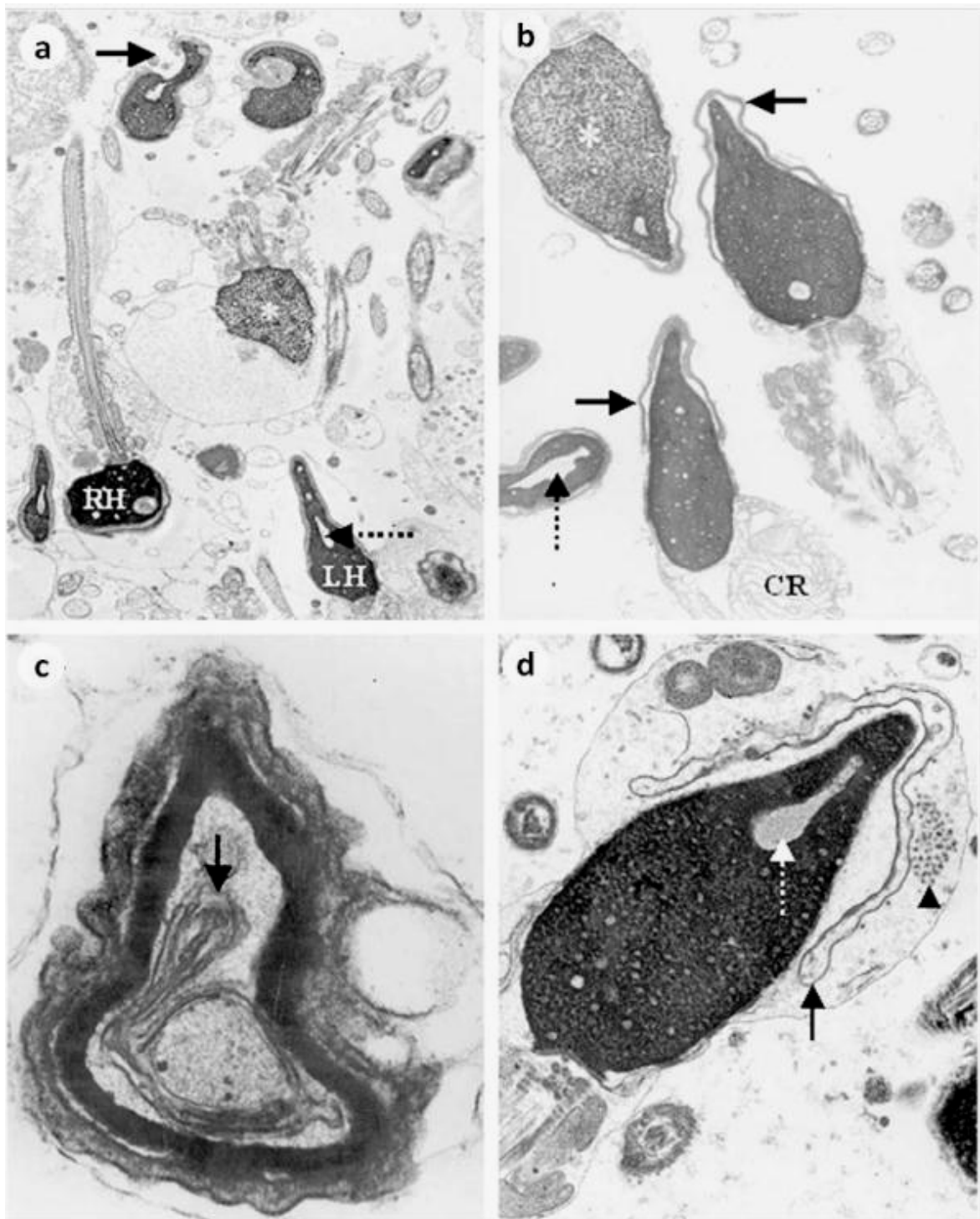
**Figura 3. a.** Interacción de *C. trachomatis* y *Mycoplasmas* con leucocitos en semen de hombres infértiles o subfértiles. Fase temprana de la interacción de ambos microorganismos (flechas). **b.** Colocalización de los dos tipos de bacterias, se observan en los cuerpos de inclusión. Gallegos-Ávila *et al.*, 2009b.



**Figura 4.** Fagocitosis de espermatozoides en muestras seminales de hombres subfértiles o infértiles infectados con *C. trachomatis* y *Mycoplasmas*. Etapas tempranas de la adherencia de la cabeza del espermatozoide a la superficie de los leucocitos y etapas tardías con las cabezas de espermatozoides rodeadas por pseudópodos de los leucocitos. A. Fagocitosis completa de la cabeza de espermatozoides (flecha) junto con segmentos del flagelo espermático (cabezas de flecha). B. Leucocitos observados fagocitando la pieza media y otros segmentos del flagelo (cabeza de flecha), junto con inclusiones bacterianas (cabeza de flecha). Magnificación original, 4400x en A y 7,000x en B. Gallegos-Avila 2009 b.

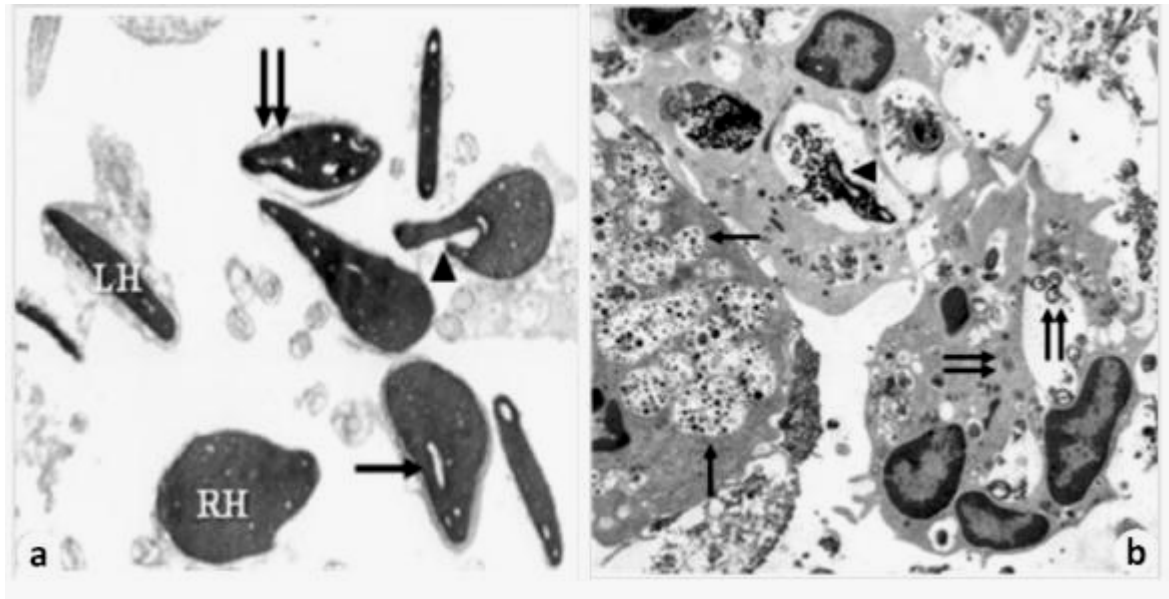
El engrosamiento del flagelo del espermatozoide, por incorporación de bacterias a su citoplasma, fue la alteración más frecuente de los espermatozoides en los hombres infértiles con infección por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasmas* genitales.

El mayor poder resolutivo del examen con microscopio óptico del corte semifino (1000x) y del corte ultrafino, evaluado con microscopio electrónico de transmisión, permitió la visualización de bacterias de las especies *Chlamydia* y *Mycoplasma*, que, por sus pequeñas dimensiones, se han considerado difíciles de diagnosticar por métodos citológicos convencionales. Además, en el estudio del corte semifino, la menor capacidad de apreciar detalles de ultraestructura se vio compensada por la posibilidad de explorar mayor superficie de la muestra, lo que permitió la cuantificación de los hallazgos observados y, de este modo, establecer criterios más fidedignos del grado y de la severidad de las alteraciones del líquido seminal causadas por *Chlamydias* y por *Micoplasmas* en pacientes con IGU (Gallegos *et al.*, 2009d). (Fig. 7).

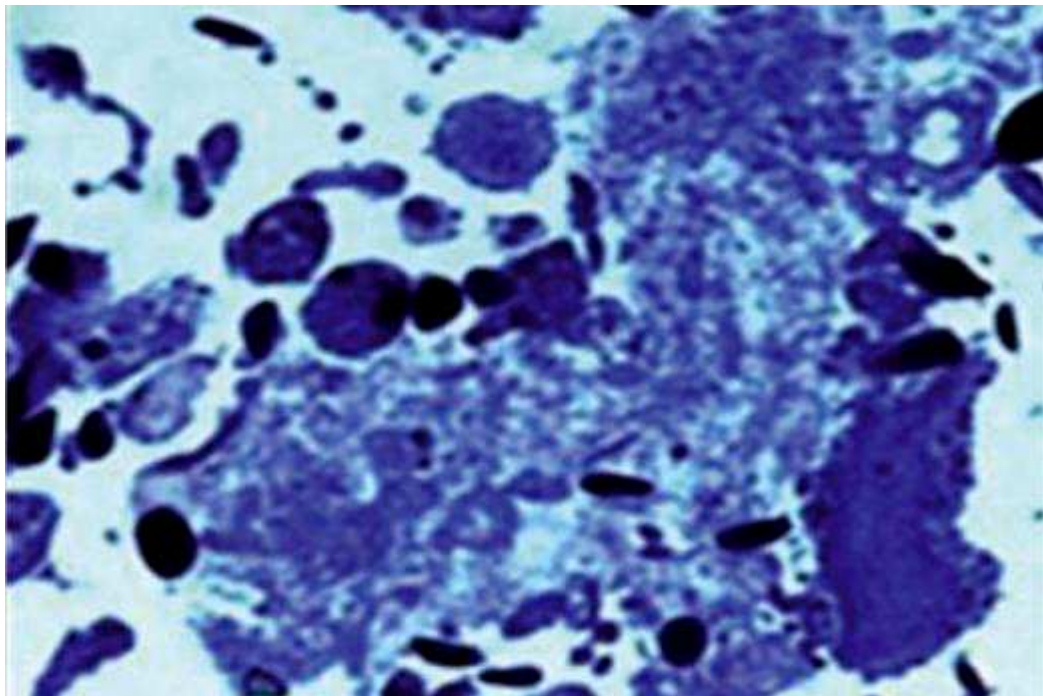


**Figura 5.** Daño de los espermatozoides en muestras seminales de hombres subfértiles infectados con *C. trachomatis* y *Mycoplasmas*. **a.** Anormalidades que incluyen cabezas redondas (RH), cabezas agrandadas (LH), y membranas nucleares parcialmente rotas (flecha). Vacuolas dentro de la cromatina nuclear (flecha punteada), y espermatozoides con un patrón de pérdida de la malla de cromatina microgranular-fibrillar (asterisco). **b.** Los acrosomas presentan protuberancias (flechas) los residuos citoplásmicos, conteniendo vacuolas y cuerpos membranosos multilaminares (CR). Las vacuolas dentro de la cromatina (flechas punteadas), y espermatozoides con un patrón de pérdida de la malla de cromatina microgranular-fibrillar (asterisco). **c.** Cuerpos multilaminares dentro de una vacuola se observaron en la cromatina nuclear (flecha). **d.** asociación física entre espermatozoides y bacterias (cabeza de flecha) se observaron en varias muestras seminales. En varias células los acrosomas están desprendidos (flechas). Magnificación original, 3,000x en A, 7,000x en B, 20,000x en C y 12,000x en D. Gallegos-Ávila, 2009b.





**Figura 6. a.** Anormalidades espermáticas observadas en el semen de los pacientes subfértiles infectados con *C. trachomatis* y *Mycoplasma*. Cabezas redondas (RH), cabezas alargadas (LH), vacuolas dentro de la cromatina (flechas), acrosomas con protuberancias (doble flecha), ruptura parcial de la membrana nuclear (flechas), espermatozoides con descompactación de la cromatina (\*). **b.** Alteraciones ultraestructurales en el semen de los pacientes subfértiles infectados con *C. trachomatis* y *Mycoplasma*. Colocalización de dos tipos de bacterias se observan incluidos en los leucocitos (flechas). Fagocitosis de cabezas (flecha –cabeza) y segmentos del flagelo de espermatozoides (doble flecha). Des compactación de la cromatina del espermatozoide en el interior de la célula fagocítica (punta de flecha). Gallegos-Ávila et al., 2010c.



**Figura 7.** Imagen panorámica del corte semifino de líquido seminal en la que se observa restos celulares y espermatozoides con signos de autólisis asociados a la presencia de bacterias. Microscopía de campo claro, 1000x. Gallegos-Ávila et al., 2009.



Actualmente las evidencias de daño molecular espermático, especialmente de ADN, están marcando un cambio en tratamientos convencionales de protocolos contra infertilidad. La capacidad letal y daño por especies reactivas de oxígeno que indujo apoptosis, peroxidación lipídica y ruptura cromosómica, está siendo considerado subyacente a la infección e inflamación de conductos seminíferos, y crea un ambiente perjudicial y nocivo para los espermatozoides y su capacidad de fertilización normal (Agarwal y Said, 2004; Eley *et al.*, 2005; Corinne *et al.*, 2009). *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasmas* genitales (*Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*) están presentes en infecciones silentes de pacientes infértiles y causan apoptosis espermática, lipoperoxidación de la membrana citoplásmica, y alteraciones en el test SCD (Halosperm Kit, Halotech DNA SL, Madrid, España). Aunado a la sutileza de signos y síntomas de esta infección, es muy frecuente que el diagnóstico de estas bacterias presente algunos obstáculos. Dependiendo del sitio de localización, el estadio de infección, la calidad de la respuesta inmune, la coexistencia de otros gérmenes, la producción de lesiones fibrosas y quísticas que atrapan bacterias, y la dificultad de muestreo; el análisis microbiológico resulta en falsos negativos. (Gallegos-Ávila *et al.*, observaciones y datos no publicados). De acuerdo con nuestros resultados, indistintamente si las concentraciones de leucocitos están debajo del nivel de leucocitospermia recomendado por la WHO, los hallazgos citológicos que permitan sospechar procesos infecciosos en el análisis seminal, deberían ser considerados de extrema importancia; inclusive cuando no se ha podido identificar un microorganismo.

El análisis por microscopía de luz en alta resolución y preparaciones de alto contraste en cortes semifinos, resulta ser una importante herramienta que ha probado la relevancia en infección por gérmenes atípicos que pueden ser ignorados en el estudio de pacientes infértiles. El hallazgo de partículas bacterianas de *Chlamydia* y *Mycoplasma*, dentro y adheridas a células realizadas en cortes semifinos con microscopía de luz, Los patrones morfológicos de infección seminal por *Chlamydia* y *Mycoplasma* fueron caracterizados por bacteria y espermatozoides dañados, fagocitados por polimorfonucleares y macrófagos, células epiteliales infectadas, así como numerosos fragmentos citoplasmáticos demostrando intensa autólisis. Las vacuolas intranucleares conteniendo bacterias y flagelos enrollados, y adelgazados por bacterias en el citoplasma, fueron signos citomorfológicos de infección espermática. Aunque el análisis de secciones semifinas tiene menos resolución que la microscopía electrónica, y no permite apreciar detalles ultraestructurales,

resulta ventajoso para el estudio de los cambios citopatológicos por infección a nivel seminal. La mayor área analizada de la muestra que se logra con esta técnica permite aplicar análisis cuantitativos, a definir mejor la gravedad de los daños y el rol del fenómeno inflamatorio en el proceso infeccioso. Esta información puede constituir una mejor base para el tratamiento y pronóstico de las infecciones genitales por gérmenes atípicos. El estudio del corte semifino del líquido seminal ha permitido establecer la importancia de la infección genital como un factor etiológico de infertilidad, y su impacto en el fracaso de la reproducción asistida.

## **2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

Por ser clínicamente silenciosas, las infecciones genitourinarias que afectan la fertilidad del hombre pasan desapercibidas con mucha frecuencia, y es posible que lleguen a generar a lo largo de los años lesiones que pueden ser irreversibles. Cuando se trata de ofrecer un tratamiento oportuno el clínico se encuentra con la dificultad diagnóstica que presentan los gérmenes atípicos que se han asociado a esta condición. De particular interés ha sido el caso de *Chlamydia trachomatis* que en algunas áreas geográficas han llegado a ser hiperendémicas y por su asociación, no solo con la incapacidad de procreación de las parejas, sino también con complicaciones ginecológicas y obstétricas y materno-infantiles.

La importancia de las infecciones genitourinarias tiene que ser establecida a la luz del diagnóstico preciso de los gérmenes causales. Los mecanismos de lesión podrán ser generales o específicos del germen o de una combinación precisa de gérmenes. Para el caso específico de *Chlamydia trachomatis* el diagnóstico de su presencia en el líquido seminal sigue ofreciendo dificultad aun aplicando pruebas moleculares que se consideran prácticamente infalibles como la PCR.

Los estudios citomorfológicos del líquido seminal realizados con técnicas de alta resolución han permitido un acercamiento a la comprensión de los mecanismos de lesión y a la dimensión del daño espermático asociado a las infecciones seminales. Sin embargo el diagnóstico basado en características morfológicas no es en la actualidad considerado como válido, por lo que una combinación de métodos moleculares in situ aunado a la evaluación morfológica pudiera permitir conclusiones más válidas.

Antes de la aplicación de la PCR para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* la IFD con anticuerpos monoclonales fue considerada como estándar de oro para el diagnóstico de esa bacteria. Hasta nuestro conocimiento esta técnica nunca fue aplicada en estudios sistemáticos a muestras seminales en fresco ni fijadas. Un análisis de concentrados celulares de hombres con infección seminal puede ser útil para verificar la eficacia de ésta técnica diagnóstica, que aparejado a la descripción morfológica detallada pudiera aportar evidencias sobre los mecanismos de lesión espermática.

### **3. OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

**PRIMERO.** Describir los antecedentes y datos clínicos, presentes en pacientes con infección genitourinaria e incapacidad para procrear, relacionándolos con el diagnóstico microbiológico en secreciones genitales de *Chlamydia trachomatis* y gérmenes asociados.

**SEGUNDO.** Describir los cambios seminales y espermáticos indicadores de inflamación, presentes en pacientes con infección genitourinaria e incapacidad para procrear, y su asociación el diagnóstico microbiológico de *Chlamydia trachomatis* y gérmenes asociados, comparándolos contra las características seminales de voluntarios sanos no infectados.

**TERCERO.** Describir los cambios citomorfológicos indicadores de inflamación, presentes en el corte semifino del sedimento seminal de pacientes con infección genitourinaria e incapacidad para procrear y su asociación con la presencia de *Chlamydia trachomatis* y gérmenes asociados, comparándolos contra las características seminales de voluntarios sanos no infectados.

**CUARTO.** Comprobar que la eficacia de la técnica de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína, para demostrar la presencia de partículas bacterianas correspondientes a *Chlamydia trachomatis*, en cortes semifinos del sedimento seminal incluido en epoxiresina, es similar a la del diagnóstico basado en las características morfológicas del germen en el mismo tipo de preparaciones.

## **4. PACIENTES Y MÉTODOS**

## **4.1 PACIENTES**

Se seleccionaron de forma aleatoria 80 hombres subfértiles de la base de datos de pacientes existentes de la consulta de Andrología y del Laboratorio de Andrología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en la ciudad de Monterrey, México. Estos pacientes incluidos habían acudido a evaluación clínico-andrológica de infertilidad conyugal de causa no conocida y refractaria a tratamientos.

Los parámetros de inclusión para la selección de los pacientes y de las muestras de este estudio comprendieron: 1. Que los pacientes tuvieran por lo menos una muestra seminal fijada en glutaraldehído y procesada mediante las técnicas de análisis de microscopía electrónica. 2. A partir de los datos de las historias clínicas, la presencia de signos y síntomas compatibles con infección genitourinaria, ya fuera como antecedente o al estar presentes en el momento de la evaluación clínica. 3. La existencia de diagnósticos y tratamientos para IGU y de alteraciones seminales previas compatibles con el proceso infeccioso de la vía espermática.

En cada caso se tomaron en cuenta: la edad del paciente, tipo de infertilidad (primaria o secundaria) y el tiempo de evolución de la infertilidad. Como datos clínicos complementarios se consideraron: la presencia o antecedentes de varicocele y varicocelectomía previa, y los datos de infección ginecológica de la cónyuge. Éstos incluyeron, entre otros, la presencia de signos y síntomas de infecciones, así como los diagnósticos microbiológicos y tratamientos actuales o previos para infección genital. Se consideraron también la presencia de obstrucción tubaria y los antecedentes de pérdida gestacional y los tratamientos previos de reproducción asistida fallidos.

Además se consideraron los resultados del examen preliminar del líquido seminal donde se comprobó, en todos los participantes de este estudio, la presencia de espermatozoides en concentración superior a un millón por ml de eyaculado, que permitiese el análisis del sedimento suficiente para el estudio citomorfológico.

El grupo control se constituyó con 10 voluntarios sanos y fértiles, con paternidad comprobada, seminograma normal y con pruebas microbiológicas negativas, cuyas cónyuges no revelaron al interrogatorio signos o síntomas de infección ginecológica.



## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 *Determinaciones Microbiológicas*

Todos los casos seleccionados contaban con evaluación microbiológica de secreciones genitales, realizada en ambos cónyuges, e incluyeron los métodos que a continuación se describen.

#### 4.2.1.1 Prueba de Inmunofluorescencia Directa con Anticuerpos Anti-Chlamydia

En todos los pacientes seleccionados y en los individuos del grupo control se realizó, mediante métodos de inmunofluorescencia directa, la detección de *C. trachomatis*, usando un anticuerpo monoclonal anti-Chlamydia (CHLAMYDIA DIRECT IF (ID)®, BIOMERIEUX SA). Para ello, se tomaron muestras del exfoliado obtenido del extremo terminal de la uretra peneana.

Estas muestras fueron obtenidas por lo menos una hora después de la última micción; en pacientes que no aceptaron la toma de la uretra, las muestras para estudio bacteriológico se obtuvieron del sedimento celular, después de la centrifugación del líquido seminal a 1400 rpm, durante 10 minutos. Las muestras ginecológicas se obtuvieron del fondo de saco vaginal, superficie exocervical y superficie del endocervix, con hisopos estériles y cepillos de exfoliación, estando las pacientes fuera del período menstrual, sin aplicación previa de ningún medicamento vaginal y con abstinencia sexual de dos a tres días. Las muestras obtenidas se colocaron directamente sobre un portaobjetos, se fijaron con 400 µl de metanol y se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta que se evaporó el excedente.

Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo monoclonal fluorescente anti-*Chlamydia* durante 30 minutos a temperatura controlada de 25°C. Después se retiró el exceso de reactivo con agua destilada y se colocó el cubreobjetos sellándose con una gota de glicerol. Las muestras se observaron con un microscopio de fluorescencia (Axiostar, Carl Zeiss), empleando objetivo de 63x y ocular de 10x/18. Para cada observación se verificó la calidad del reactivo procesando un portaobjetos de control negativo y uno de control positivo (CHLAMYDIA DIRECT IF (ID)®, (C+/C-), BIOMERIEUX SA). De acuerdo a los fabricantes del Kit diagnóstico, se consideró positivo el resultado de esta prueba cuando se observaron más de 10 cuerpos elementales fluorescentes en el total de la muestra biológica analizada.

#### 4.2.1.2 Cultivo para la Identificación de *Mycoplasma sp.* y *Ureaplasma sp.*

Para la identificación de micoplasmas y ureaplasmas utilizamos un sistema de identificación bioquímica (API), Mycoplasma IST 2 (BIOMERIEUX SA), que contiene los sustratos específicos para el cultivo e identificación de varias especies de: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma hominis*. Además, mediante este sistema se pudo realizar una cuantificación de la concentración de gérmenes, así como la comprobación de su susceptibilidad a los antibióticos.

Las muestras de líquido seminal se colocaron en 3 mL de medio de transporte que contenía peptona en solución de cloruro de sodio 0,65%, para inhibir el crecimiento de gérmenes Gram positivos y Gram negativos. La muestra diluida en el medio de transporte se mezcló con el medio de cultivo liofilizado que contiene los extractos lábiles del medio de cultivo: extracto de levadura, suero de caballo, urea, arginina, rojo fenol como indicador de pH, antibióticos y un antifúngico (para inhibir el crecimiento de flora bacteriana y micótica contaminante de la muestra). Una vez resuspendida la muestra de los pacientes con el liofilizado, se colocó una alícuota de 55 µL en cada uno de los 16 pocillos de la placa de multipocillos estériles (Tabla II); de este modo se puede realizar el aislamiento, la identificación y la prueba de susceptibilidad de los gérmenes frente a los antibióticos.

**Tabla II.** Distribución de las muestras en los distintos pocillos

|  |   |
|--|---|
| Pocillo 1: Control de muestra                            | Pocillos 8 y 9: Josamicina (2 y 8 mg/L)     |
| Pocillo 2: Identificación de <i>U. urealyticum</i>       | Pocillos 10 y 11: Ofloxacin (1 y 4 mg/L)    |
| Pocillo 3: Identificación de <i>M. hominis</i>           | Pocillos 12 y 13: Eritromicina (1 y 4 mg/L) |
| Pocillo 4: Título de <i>U. urealyticum</i> $>0=10^4$ UCC | Pocillos 14 y 15: Tetraciclina (4 y 8 mg/L) |
| Pocillo 5: Título de <i>M. hominis</i> $>0=10^4$ UCC     | Pocillo 16: Pristinamicina (2 y 8 mg/L)     |
| Pocillos 6 y 7: Doxiciclina (4 y 8 mg/L)                 |   |

Una vez depositada la muestra en los pocillos, se cubrió cada uno con 2 gotas de aceite mineral estéril para crear un ambiente de anaerobiosis y evitar la evaporación del medio. La incubación se llevó a cabo a 37°C durante 72 horas para *U. urealyticum* y 5 días para *M. hominis* y *M. fermentans*. Al término del período de incubación, la prueba se consideró positiva para *U. urealyticum* cuando en el pocillo correspondiente el indicador, que originalmente es incoloro, viró a color naranja; en el cultivo positivo para *M. hominis*, el indicador viró a rojo cereza, y, por último, cambió a amarillo intenso en el caso de presencia de *M. fermentans*. El medio de transporte remanente, formado por peptona en

solución salina, debió permanecer transparente; contrariamente, la presencia de turbidez fue indicadora de contaminación.

#### 4.2.1.3 Cultivos Generales

Tanto en la muestra seminal, como en el exudado cérvico-vaginal se realizó un cultivo general en medios selectivos para gérmenes aerobios (EMB), agar sangre y agar azida de sodio, y anaerobios (agar chocolate y agar sangre en cámara de CO<sub>2</sub>) (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, USA). Las muestras se incubaron a 37° C, durante 24 horas, seguido del aislamiento y resiembra de las colonias bacterianas en medios selectivos, con el fin de su correcta identificación y la aplicación de la susceptibilidad a antibióticos.

#### 4.2.2 Estudio Citomorfológico en Corte Semifino

La evaluación de los cambios del líquido seminal mediante métodos de cortes semifinos se realizó también en los 80 pacientes varones incluidos en el presente estudio. Dependiendo de la concentración de espermatozoides, una o dos muestras seminales (obtenidas igualmente con tres a siete días de abstinencia) fueron procesadas para su inclusión en epoxiresina (LX112, Pelco Internacional).

Después de la licuefacción del líquido seminal, se agregaron 2 a 3 mL de buffer de fosfatos 0,2M, de pH 7,4; la muestra se homogenizó y después se centrifugó a 300 g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y al sedimento se le agregó el fijador glutaraldehído (Pelco Internacional) al 2,5%, preparado en el mismo buffer, conservando la muestra a 4°C durante una a tres horas. La post-fijación con tetraóxido de osmio (Pelco Internacional) al 1% se realizó durante 1 hora a 4° C. La muestra seminal se deshidrató utilizando concentraciones crecientes de alcohol, reconstituyéndola mediante su centrifugación a 300 g durante 10 minutos; estos procedimientos se repitieron cuando fueron necesarios. Los bloques incluidos en epoxiresina (Medcast, Pelco Internacional) se seccionaron a 200- 500 nm con un ultramicrotomo (Sorval MT-2, Porter Blum, Sorvall). Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina al 1% (Merck Darmstadt) y fueron observadas en un microscopio (Carl Zeiss) de campo claro a 1,200 aumentos.

En la evaluación de los cortes semifinos se registraron semicuantitativamente los siguientes parámetros:

1. Presencia de leucocitos polimorfonucleares
2. Presencia de macrófagos

3. Presencia de células epiteliales
4. Presencia de restos citoplásmicos
5. Presencia de fagocitosis de espermatozoides
6. Presencia de cambios autolíticos
7. Presencia de detritus celulares
8. Presencia de fagocitosis de espermatozoides
9. Presencia, concentración y localización de cocos
10. Presencia, concentración y localización de bacterias pleomórficas
11. Presencia, concentración y localización de cuerpos elementales de Chlamydia
12. Presencia, concentración y localización de cuerpos reticulares por Chlamydia
13. Presencia de células espermátogénicas inmaduras, cristales y cualquier otra estructura.

Los cortes semifinos teñidos con azul de toluidina al 1% y analizados mediante el estudio citomorfológico, fueron sometidas a un proceso de desplastificación controlada para la posterior búsqueda de *C. trachomatis* mediante IFD con anticuerpos monoclonales.

Para la eliminación de la resina en el corte semifino utilizamos como base el método de Steffens (1978), y las recomendaciones de Ojeda (1997); el método de desplastificación puede ser utilizado con todo tipo de epoxirresinas y su principio está basado en la utilización del metóxido sódico.

Se procedió a la estandarización y adecuación del método de desplastificación resumiéndose de la siguiente manera:

Colocamos el portaobjetos con la muestra de corte semifino de manera horizontal y cubrimos completamente el portaobjetos con una solución de metóxido sódico (2.5 gr de sodio metálico; 250mL de metanol y 50 mL de Benceno) por 1 minuto.

Como segundo paso se lavó el portaobjetos con una solución de metanol-benceno (1-1) y se agregó una mezcla de metanol benceno-metóxido sódico al 50% (1 volumen de metanol-benceno con un volumen de metóxido sódico) por 1 minuto.

Posteriormente se sustituyó esta solución con una mezcla de metanol-benceno-metóxido sódico al 25% por un minuto.

Por último se lavó el portaobjetos con una solución de metanol-benceno (1-1) y se evaporaron los solventes en la estufa incubadora a 37°C.

Una vez eliminado el excedente, se aplicó la técnica de inmunofluorescencia directa para la identificación de *C. trachomatis* siguiendo el procedimiento descrito al inicio del

capítulo de métodos, con la modificación a la técnica en el tiempo de incubación a 45 minutos en cámara húmeda y temperatura de 34°C.

#### **4.2.3 *Análisis Estadístico***

Se creó una base de datos informatizada utilizando el programa Excel (Microsoft Office, Versión 2007). Los datos fueron recogidos de la historia clínica y las hojas de recogida de datos de laboratorio así como del análisis del corte semifino. Una vez limpiada la base de datos se realizó el análisis estadístico utilizando el programa estadístico SPSS 17 (SPSS Inc).

##### **4.2.3.1 Tamaño Muestral**

En este estudio se analizaron las muestras de semen de varones subfértiles mediante dos técnicas empleadas para determinar la presencia de *C. trachomatis* en los cortes semifinos de líquido seminal de los pacientes seleccionados.

Para demostrar que entre ambas técnicas no existe una diferencia en porcentajes de positividad de  $\pm 0.5\%$ , se seleccionó de manera aleatoria un total de 80 pacientes de la base de datos existente. Con este número de casos y partiendo del hecho de que la técnica estándar obtiene un nivel de positividad de al menos el 85% y que la nueva técnica como mínimo obtendrá un porcentaje de respuesta del 45%, se aceptó la hipótesis de no-inferioridad en la comparación de proporciones mediante el test Z de Fisher para un nivel real de significación del 0.025 y una potencia del 80%.

##### **4.2.3.2 Estadística Descriptiva**

Las variables cualitativas se resumieron mediante el cálculo de frecuencias absolutas para cada modalidad y relativas, expresadas en porcentajes. En el caso de variables cuantitativas, se procedió al cálculo de medidas de tendencia central (media y/o mediana) y de dispersión (desviación estándar). Para ciertas variables se calculó el error estándar de la media. Las representaciones gráficas utilizadas estuvieron en función del tipo de variable, diagrama de barras o sectores, en el caso de variables cualitativas, e histograma en el caso de variables cuantitativas.

#### **4.2.3.3 Inferencia Estadística**

Para comparar las variables cualitativas entre los diferentes grupos se aplicó la prueba de chi cuadrado (corrección de Yate). En los casos donde la frecuencia de las modalidades de las variables cualitativas era baja o nula, se procedió a la recodificación de la variable para generar tablas de contingencia de (2x2) y poder aplicar la prueba exacta de Fisher. En el caso de variables cuantitativas, se analizó el tipo de distribución que presentaban mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En el supuesto de distribuciones normales se utilizaron las pruebas t de Student o ANOVA. Ante el supuesto de no normalidad se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Todas las pruebas de hipótesis se aplicaron bajo los supuestos de biteralidad, nivel de significación  $p \leq 0,05$  y potencia (1- $\beta$ ) del 80%. Para el cálculo de los distintos estadísticos se utilizará el programa SPSS versión 17 (SPSS Inc).

#### **4.2.3.4 Selección Aleatoria**

De la base de datos existente en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se seleccionaron de forma aleatoria 80 hombres subfértiles. Para dicha selección se utilizó el programa SPSS usando la opción de selección aleatoria de casos la cual utiliza un método pseudoaleatorio.

#### **4.2.3.5 Evaluación de las Muestras**

Para el análisis de las muestras se utilizó el método de doble ciego, las muestras fueron identificadas con un número asignado por una persona que no esté involucrada en el estudio. La evaluación fue realizada por dos especialistas, y en caso de llegar a diagnósticos diferentes, la muestra fue revisada por un tercer especialista cuya decisión fue concluyente.

## **5. RESULTADOS**

Para corroborar la identificación de partículas bacterianas morfológicamente compatibles con *Chlamydia trachomatis*, detectadas en el corte semifino del sedimento seminal de hombres subfértiles, se compararon los resultados de las observaciones al microscopio de luz de campo claro de los cortes teñidos con azul de toluidina a 1000x, con el resultado de las observaciones hechas con el microscopio de fluorescencia (50x), de las mismas secciones semifinas aplicando la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD).

Como hemos indicado en el capítulo de Pacientes y Métodos, los resultados que presentamos a continuación se obtuvieron del análisis del material de 80 pacientes, existente en los archivos del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La descripción de las observaciones consideradas como variables cuantitativas se han resumido mediante medidas de tendencia central (media y/o moda), y las variables cualitativas se presentan como frecuencias absolutas y frecuencias relativas en forma de porcentajes. En aquellos puntos en los que se muestran comparaciones entre grupos, estas se realizan bajo el concepto de ausencia o presencia del rasgo sometido a estudio en cada grupo.

## 5.1 DATOS CLÍNICOS

El universo de nuestro estudio estuvo constituido por al menos 1200 muestras seminales de pacientes con infertilidad conyugal de causa desconocida, a partir de la cual se seleccionaron al azar 80 casos en los que se contó con historia médica clínico-andrológica. Las muestras seminales estudiadas fueron obtenidas de acuerdo a las guías que señala la WHO, previa abstinencia sexual de 3 a 7 días, procesándose de inmediato para la medición de los parámetros convencionales del seminograma que incluyen aspectos físicos y químicos: volumen, color, tiempo de licuefacción, densidad y pH. Después de realizar el seminograma, de acuerdo al volumen remanente de la muestra seminal y la concentración espermática, se solicitó una segunda muestra de líquido seminal, con el mismo tiempo de abstinencia, para la realización de las pruebas bacteriológicas: cultivo general, cultivo en medios selectivos para *Mycoplasmas* genitales y *Ureaplasma urealyticum*. A partir de la misma muestra, una alícuota fue procesada para ultramicrotomía. Adicionalmente, una muestra de exfoliado y exudado uretral, tomado con previo aseo genital, se procesó para realizar la prueba de IFD para *Chlamydia trachomatis*.



### 5.1.1 Grupos de Estudio

El grupo control quedó constituido por 10 hombres voluntarios sanos que ya habían tenido hijos, éstos carecían de signos o síntomas y cambios seminológicos sugestivos de infección genitourinaria. Las muestras seminales de los hombres fértiles fueron estudiadas bajo las mismas condiciones y con la misma metodología que los pacientes. El resultado de la evaluación microbiológica fue rigurosamente negativo.

Los pacientes infectados se agruparon de acuerdo al diagnóstico microbiológico de la siguiente manera:

**Grupo 1.** Constituido por veintidós casos positivos para *Chlamydia trachomatis* y para alguna de las tres especies de Mycoplasmas genitales investigados: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma fermentans*.

**Grupo 2.** Correspondiente a trece pacientes con prueba de IFD positiva para *Chlamydia trachomatis* pero que resultaron negativos en el cultivo de líquido seminal selectivo para *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma hominis*.

**Grupo 3.** Formado por treinta y un pacientes en los se aisló *Ureaplasma urealyticum* y/o alguna especie de Mycoplasma y cuya muestra uretral fue negativa en la prueba de IFD para *Chlamydia trachomatis*.

**Grupo 4.** Correspondiente a catorce pacientes que resultaron negativos para la prueba de *Chlamydia trachomatis* uretral y cultivos seminales para *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma hominis*, pero para los cuales el espermocultivo general fue positivo.

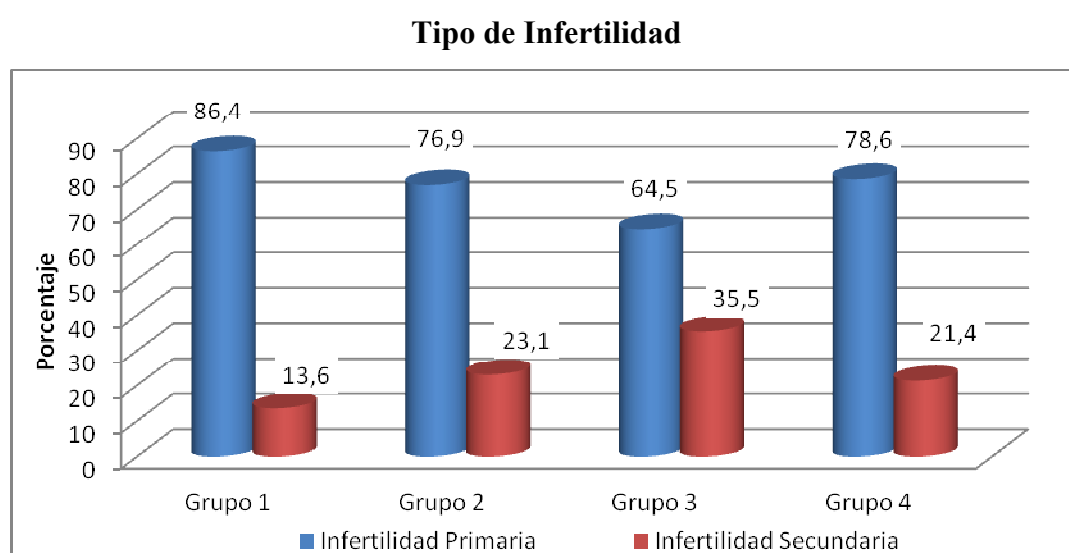
### 5.1.2 Antecedentes Clínicos del Hombre

#### 5.1.2.1 Edad

Considerando globalmente los 80 casos de pacientes estudiados, la edad varió entre 33 y 55 años, con una media de 33,96 años ( $\pm 5,68$ ). En el grupo de hombres voluntarios sanos (grupo control), la edad promedio fue de ( $30,5 \pm 6,4$ ) con un recorrido de 23 a 44 años.

### 5.1.2.2 Tipo y Tiempo de Infertilidad

El 75% (60 de los 80 casos) de los hombres con infección padecían infertilidad primaria; 25% (20 de los 80 casos) ya habían tenido hijos, pero llevaban más de un año intentando lograr un embarazo. Proporcionalmente, un número mayor de casos (86,4%) de infertilidad primaria se observó en el grupo 1 cuyo diagnóstico microbiológico comprendió la presencia de *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* o *Mycoplasma fermentans*. En el grupo 2, donde se ubicaron los pacientes en los que sólo se demostró la presencia de *Chlamydia trachomatis*, el porcentaje de casos con infertilidad primaria fue de 76,9%. En el grupo 3, en los que sólo se demostró la presencia de *Mycoplasmas*, el 64,5% de los pacientes tenían infertilidad primaria. En el grupo 4, en los que sólo se demostró la presencia de gérmenes distintos de Clamidias y *Mycoplasmas*, el 78,0% correspondieron a éste tipo de infertilidad. (Figura 8a).

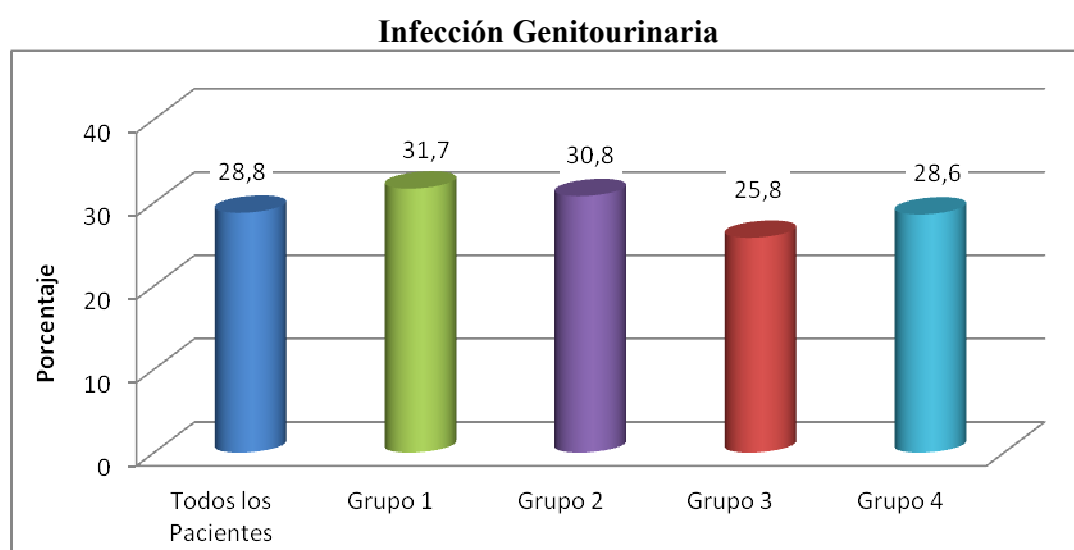


**Figura 8a.** Distribución de la casuística según el tipo de infertilidad y el diagnóstico microbiológico. Infertilidad Primaria e Infertilidad Secundaria.

El tiempo de evolución del problema de fertilidad, considerado a partir de la fecha de suspensión del método de anticoncepción o del inicio de la convivencia conyugal no protegida, varió entre 3 años con tres meses y 14 años con siete meses, con un promedio de  $47,09 \pm 37,87$  meses.

### 5.1.2.3 Antecedentes de Infección Genitourinaria

En 27 casos estudiados, sin incluir los diez del grupo control, se descartó tanto la presencia de sintomatología compatible con la existencia de proceso infeccioso, al momento de la evaluación, como el antecedente de algún proceso de infección genitourinaria previo. En 23 pacientes (28,8%), se encontraron en la anamnesis clínica realizada como parte de éste estudio, antecedentes, signos y/o síntomas de infección genitourinaria. De esta forma, en el análisis por grupos de estudio, procedió el diagnóstico clínico de IGU en 7 pacientes (31,7%) del grupo 1, 4 pacientes (30,8%) del grupo 2, 8 pacientes (25,8%) del grupo 3 y 4 pacientes (28,6%) del grupo 4 (Tabla III y FIGURA 8b).

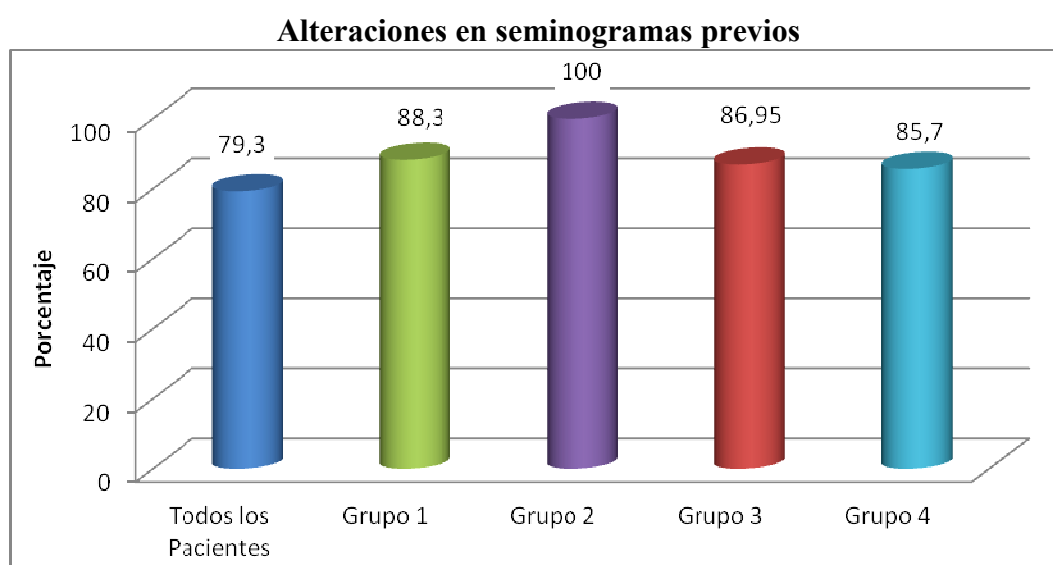


**Figura 8b.** Antecedentes Clínicos de Infección Genitourinaria de los hombres infértiles incluidos en el estudio.

### 5.1.2.4 Antecedentes de Alteraciones Seminales

La presencia de alteraciones en seminogramas previos se pudo analizar en 76 casos incluyendo los controles, en 79,3% dichos análisis mostraron rasgos sugestivos de IGU. La diferencia en la distribución por grupos, éste parámetro se presentó en el 86,3% de los pacientes del grupo 1, en el 100% de los pacientes del grupo 2, en el 87% de los pacientes del grupo 3 y en el 85,7% de los pacientes del grupo 4 (Tabla III y Fig. 8c). El 42,5% de los pacientes presentaron alteraciones seminales en el año anterior, el 25% de uno a 5 años atrás, y en el 6,3% el daño seminal se había registrado más de 5 años antes. En el caso de los 10 voluntarios sanos, no hubo exámenes seminales previos y en 7 de los hombres

subfértiles no se registró ninguna alteración en los parámetros seminales de concentración y movimiento espermáticos.



**Figura 8c.** Presencia de alteraciones en los seminogramas previos presentes en los hombres infértiles.

### 5.1.2.5 Antecedentes de Diagnóstico Microbiológico

Aunque el 77,5% de los pacientes subfértiles, carecían de evaluación microbiológica previa, el 40% de los pacientes tenían tratamientos previos o estaban bajo tratamiento al momento de esta evaluación para IGU, (Tabla III), lo cual implicó un manejo empírico de antibióticos. En los casos en los que se encontró antecedente de evaluación microbiológica previa, únicamente en el 5%, los cultivos de líquido seminal incluían la investigación de *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.*

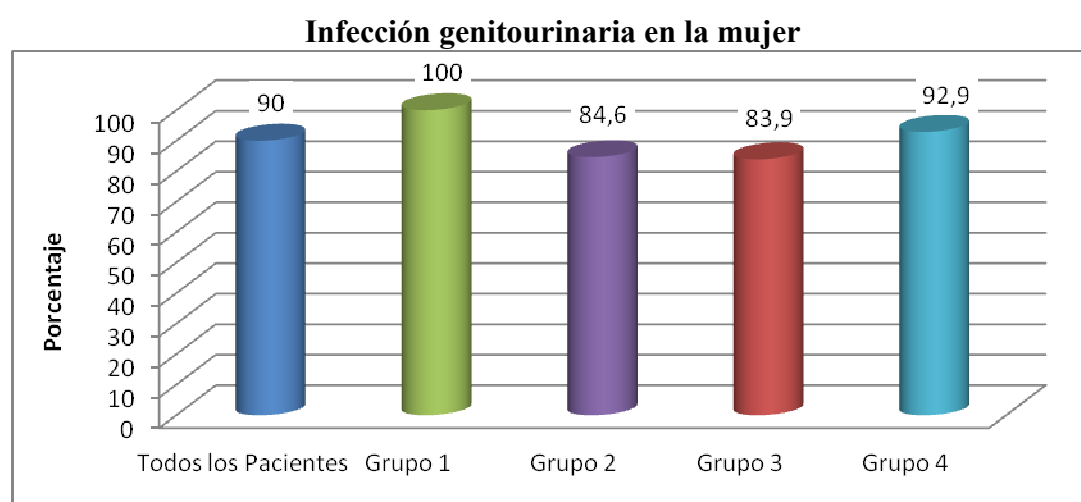
### 5.1.2.6 Presencia de Varicocele

El 48,98% de los 49 pacientes en los que se había valorado ecográficamente la presencia de varicocele, presentaron un proceso varicoso intraescrotal, ya fuera bilateral (37,5%) o unilateral (62,5%). Estos datos se pueden observar en la Tabla III. De los diez pacientes sometidos a varicocelectomía previa, cuatro habían desarrollado varicocele recidivante.

### 5.1.3 Antecedentes Clínicos de la Mujer

#### 5.1.3.1 Infección Genitourinaria

Solo cuatro (5%) de las cónyuges de los pacientes subfértiles, incluidos en éste estudio, carecían de signos, síntomas o antecedentes de IGU. Otro 5% de las 76 mujeres restantes no tuvieron evaluación clínica. De acuerdo a nuestro análisis estadístico, el 90 % de las parejas de los pacientes evaluados en este estudio tuvieron diagnóstico clínico de IGU presente al momento del reclutamiento de los casos de estudio o como antecedente. En la distribución por grupos, éste parámetro se presentó en el 100% de los pacientes del grupo 1, en 84,6% de los pacientes del grupo 2, en 83,9% de los pacientes del grupo 3 y en 92,9% de los pacientes del grupo 4 (Tabla IIIa y Fig. 9a).

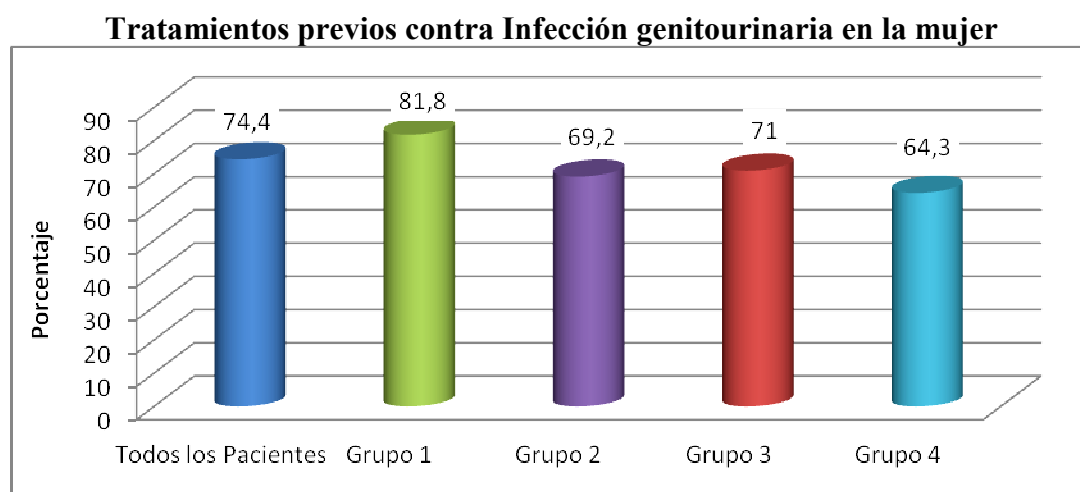


**Figura 9a.** Antecedentes de infección genitourinaria en las cónyuges de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

#### 5.1.3.2 Tratamientos Previos para Infección Genitourinaria de la Pareja

Se obtuvo información clínica ginecológica acerca de tratamientos previos para IGU en 78 pacientes, determinándose que 58 (74,4%) de ellas habían recibido algún tratamiento previo sin que se resolviera el cuadro clínico en forma definitiva: 18 casos (81,8%) del grupo 1, 9 casos (69,2%) del grupo 2, 22 casos (71%) casos del grupo 3, y 9 casos del grupo 4 (64,3%) del grupo 4. A pesar de esto, sólo 10 (12,8 %) de las mujeres tenían antecedente de estudios para diagnóstico microbiológico en secreciones genitales previos que incluían la investigación de Clamidia y Micoplasmas y habían recibido tratamiento a partir de ese diagnóstico. Al momento de este estudio, la investigación etiológica de la IGU, realizada a 79 pacientes detectó 83,54% (66 casos) de las mujeres con infección por

*Chlamydia trachomatis* y alguno de los tres Micoplasmas investigados: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* o *Mycoplasma fermentans*. El diagnóstico causal de la IGU ginecológica por grupos se presenta en la Tabla IIIa y en la Figura 9b.



**Figura 9b.** Antecedentes de tratamientos previos contra infección genitourinaria en las cónyuges de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

### 5.1.3.3 Antecedente de Pérdidas Gestacionales

Entre los antecedentes gineco-obstétricos, 26 de las pacientes (32,5%) que se interrogaron al respecto, refirieron de uno a tres abortos como parte del problema de fertilidad; 21 (80,8%), mujeres habían tenido una pérdida gestacional, cinco tenían dos abortos y dos refirieron tres abortos consecutivos, para constituir un total de 37 productos de la concepción abortados, 21 de ellos contando con 4 a 8 semanas de gestación, 10 con 9 a 10 semanas y en 6 casos no se pudo precisar el tiempo de evolución del embarazo. En el 60,7% de los abortos se había comprobado por ultrasonido pélvico transvaginal la suspensión del desarrollo embrionario previa al aborto (huevo muerto retenido) o la ausencia del embrión en la vesícula coriónica (embarazo anembriónico). En 12 pacientes se había hecho el diagnóstico de obstrucción tubaria unilateral y en 5 casos obstrucción bilateral.

### 5.1.3.4 Diagnóstico Microbiológico de Infección Genitourinaria

La distribución por grupos de acuerdo al diagnóstico bacteriológico de los antecedentes gineco-obstétricos se pueden observar en la Tabla III b.

**Tabla III.** Antecedentes clínicos y de diagnóstico de los hombres incluidos en el estudio.

|   | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupos                  |                         |                         |                         |
|---|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|   |                          |                                       | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Tipo de infertilidad</b>                   |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Infertilidad primaria                         | 0(0)                     | 60(75)                                | 19(86,4)                | 10(76,9)                | 20(64,5)                | 11(78,6)                |
| Infertilidad secundaria                       | 0(0)                     | 20(25)                                | 3(13,6)                 | 3(23,1)                 | 11(35,5)                | 3(21,4)                 |
| <b>Antecedentes de alteraciones seminales</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausencia de alteraciones                      | 10(100)                  | 13(16,3)                              | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 7(22,6)                 | 3(21,4)                 |
| Presencia de alteraciones                     | 0(0)                     | 59(73,8)                              | 16(72,7)                | 12(92,3)                | 20(64,5)                | 11(78,6)                |
| Se desconoce                                  | 0(0)                     | 8(10)                                 | 3(13,6)                 | 1(7,7)                  | 4(12,9)                 | 0(0)                    |
| <b>Años desde el diagnóstico</b>              |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Sin infección                                 | 10(100)                  | 7(8,8)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| < 1 año                                       | 0(0)                     | 34(42,5)                              | 7(31,8)                 | 8(61,5)                 | 14(45,2)                | 5(35,7)                 |
| >1 a <5 años                                  | 0(0)                     | 20(25)                                | 7(31,8)                 | 2(15,4)                 | 4(12,9)                 | 7(50)                   |
| >5 años                                       | 0(0)                     | 5(6,3)                                | 1(4,5)                  | 2(15,4)                 | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| Se desconoce                                  | 0(0)                     | 14(17,5)                              | 5(22,7)                 | 1(7,7)                  | 8(25,8)                 | 0(0)                    |
| <b>Diagnóstico clínico</b>                    |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Sin IGU ni antecedentes                       | 10(100)                  | 27(33,8)                              | 6(27,3)                 | 4(30,8)                 | 13(41,9)                | 4(28,6)                 |
| Sin IGU con antecedentes                      | 0(0)                     | 16(20)                                | 5(22,7)                 | 2(15,4)                 | 5(16,1)                 | 4(28,6)                 |
| Con IGU sin antecedentes                      | 0(0)                     | 7(8,8)                                | 2(9,1)                  | 2(15,4)                 | 3(9,7)                  | 0(0)                    |
| Con IGU con antecedentes                      | 0(0)                     | 30(37,5)                              | 9(40,9)                 | 5(38,5)                 | 10(32,3)                | 6(42,9)                 |
| <b>Tratamiento</b>                            |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Sin tratamiento                               | 10(100)                  | 40(50)                                | 10(45,5)                | 4(30,8)                 | 19(61,3)                | 7(50)                   |
| Con tratamiento previo para IGU               | 0(0)                     | 26(32,5)                              | 8(36,4)                 | 7(53,8)                 | 9(29)                   | 2(14,3)                 |
| Tratamiento actual para IGU                   | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 2(14,3)                 |
| Se desconoce                                  | 0(0)                     | 8(10)                                 | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 3(21,4)                 |
| <b>Diagnóstico de varicocele</b>              |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausencia de varicocele                        | 10(100)                  | 25(31,3)                              | 8(36,4)                 | 6(46,2)                 | 5(16,1)                 | 6(42,9)                 |
| Varicocele unilateral                         | 0(0)                     | 15(62,5)                              | 6(27,3)                 | 4(30,8)                 | 4(12,9)                 | 1(7,1)                  |
| Varicocele bilateral                          | 0(0)                     | 9(37,5)                               | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 5(16,1)                 | 2(14,3)                 |
| Se desconoce                                  | 0(0)                     | 31(38,8)                              | 7(31,8)                 | 2(15,4)                 | 17(54,8)                | 5(35,7)                 |

### 5.1.3.5 Tratamientos Previos para Fertilidad

Más de dos tercios (55) de las cónyuges de los pacientes incluidos en este estudio (68,75%) habían sido tratadas infructuosamente mediante inseminación intrauterina, habiéndose practicado en este grupo en total 185 inseminaciones intrauterinas (IIU). En catorce parejas se llevaron a cabo procedimientos de reproducción asistida: dos transferencias intratubarias de gametos (GIFT), 17 fertilizaciones *in vitro* y seis procedimientos de inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI), con transferencia intrauterina de los embriones. De los 55 pacientes tratados con IIU, 46 casos habían sido tratados con 1 a 5 inseminaciones y 9 habían sido inseminados de 6 a 15 veces. En diez parejas se habían practicado más de un tipo de procedimiento de reproducción asistida, siete de ellas reportaron más de cinco intentos por diversos procedimientos y dos

de ellas se habían sometido a 3 procedimientos de ICSI. Estos datos se representan en la Tabla IIIc.

**Tabla IIIa.** Antecedentes clínicos y de diagnóstico de las mujeres.

|  | Grupos                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|--|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|  | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Infección genitourinaria de la mujer</b>                    |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Sin IGU ni antecedentes  | 10(100)                  | 4(5,0)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| Sin IGU con antecedentes                                       | 0(0)                     | 9(11,3)                               | 4(18,2)                 | 2(15,4)                 | 0(0)                    | 3(21,4)                 |
| Con IGU sin antecedentes                                       | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 5(22,7)                 | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| Con IGU con antecedentes                                       | 0(0)                     | 53(66,2)                              | 13(59,1)                | 9(69,2)                 | 23(74,2)                | 8(57,1)                 |
| Perdidos   | 0(0)                     | 4(5,0)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 3(9,7)                  | 0(0)                    |
| <b>Tratamiento contra infección genitourinaria de la mujer</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Sin tratamiento  | 10(100)                  | 20(25,0)                              | 4(18,2)                 | 3(23,1)                 | 9(29)                   | 4(28,6)                 |
| Con tratamiento previo   | 0(0)                     | 43(53,8)                              | 8(36,4)                 | 9(69,2)                 | 17(54,8)                | 9(64,3)                 |
| Tratamiento actual   | 0(0)                     | 15(18,8)                              | 10(45,5)                | 0(0)                    | 5(16,1)                 | 0(0)                    |
| Perdidos   | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| <b>Diagnóstico microbiológico en la mujer</b>                  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Micoplasma, Clamidia y otros                                   | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 3(13,6)                 | 2(15,4)                 | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Micoplasma y Clamidia +  | 0(0)                     | 13(16,3)                              | 3(13,6)                 | 4(30,8)                 | 5(16,1)                 | 1(7,1)                  |
| Sólo Micoplasma  | 0(0)                     | 12(15,0)                              | 4(18,2)                 | 1(7,7)                  | 7(22,6)                 | 0(0)                    |
| Sólo Clamidia  | 0(0)                     | 4(5,0)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| Micoplasma y otros   | 0(0)                     | 22(27,5)                              | 6(27,3)                 | 3(23,1)                 | 11(35,5)                | 2(14,3)                 |
| Clamidia y otros   | 0(0)                     | 9(11,3)                               | 2(9,1)                  | 3(23,1)                 | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| Sólo otros   | 0(0)                     | 13(16,3)                              | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 10(71,4)                |
| Perdidos   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Aborto</b>  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| No abortos   | 10(100)                  | 52(65,0)                              | 13(59,1)                | 8(61,5)                 | 19(61,3)                | 12(85,7)                |
| < 8 semanas  | 0(0)                     | 21(26,3)                              | 7(31,8)                 | 4(30,8)                 | 10(32,3)                | 0(0)                    |
| > 8 semanas  | 0(0)                     | 5(6,3)                                | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| Perdidos   | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(14,3)                 |
| <b>Obstrucción tubárica</b>                                    |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Sin obstrucción  | 10(100)                  | 46(57,5)                              | 12(54,5)                | 8(61,5)                 | 17(54,8)                | 9(64,3)                 |
| Obstrucción tubárica unilateral                                | 0(0)                     | 12(15)                                | 5(22,7)                 | 2(15,4)                 | 4(12,9)                 | 1(7,1)                  |
| Obstrucción tubárica bilateral                                 | 0(0)                     | 5(6,3)                                | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| Perdidos   | 0(0)                     | 17(21,3)                              | 3(13,6)                 | 2(15,4)                 | 8(25,8)                 | 4(28,6)                 |

**Tabla IIIb.** Antecedentes gineco-obstétricos de las cónyuges de los pacientes incluidos en el estudio.

| <b>Pérdida gestacional temprana. 28 Pacientes (38.57%; Me=2 de 1-5; Total=53 abortos)</b> |                                     |                     |                     |
|---|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Número de Abortos   | Pacientes que presentaron el evento | Número de Productos | Tiempo de gestación |
| 1   | 21                                  | 21                  | 4-8 semanas         |
| 2   | 5                                   | 10                  | 9-10 semanas        |
| 3   | 2                                   | 6                   | No se precisa       |
| <i>Total de Abortos en las 28 pacientes: 37</i>   |                                     |                     |                     |



**Tabla IIIc.** Antecedentes de tratamientos previos de reproducción asistida realizados en las cónyuges de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

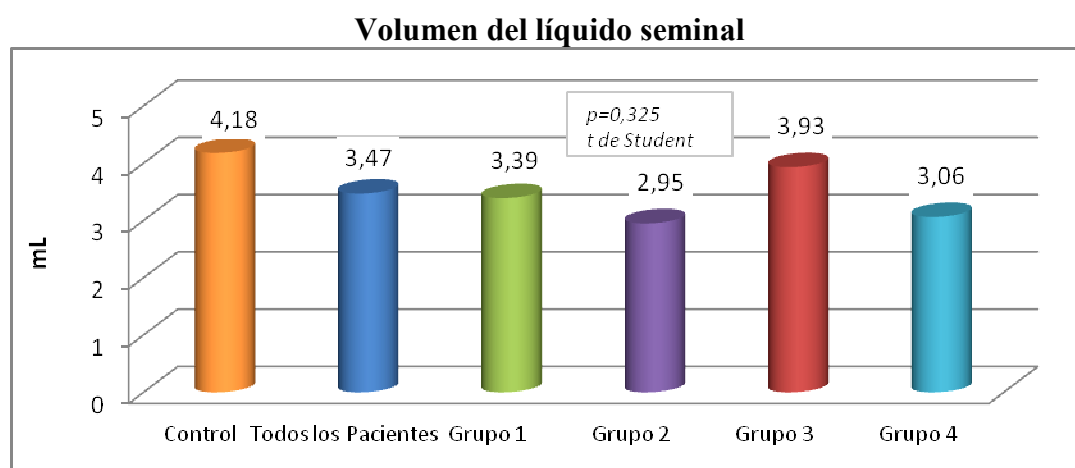
| Inseminación Intrauterina (IUI)   |                                     | Fertilización <i>in-vitro</i> (IVF) |                                     | Inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) |                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|-------------------------------------|
| Número de IUI/Paciente            | Pacientes que presentaron el evento | Número de IVF/Paciente              | Pacientes que presentaron el evento | Número de ICSI/Paciente                               | Pacientes que presentaron el evento |
| 1                                 | 7                                   | 1                                   | 4                                   | 1   | 1                                   |
| 2                                 | 14                                  | 2                                   | 2                                   | 2   | 1                                   |
| 3                                 | 13                                  | 4                                   | 1                                   | 3   | 2                                   |
| 4                                 | 9                                   | 5                                   | 1                                   |   |                                     |
| 5                                 | 3                                   |                                     |                                     |   |                                     |
| 6                                 | 3                                   |                                     |                                     |   |                                     |
| 8                                 | 2                                   |                                     |                                     |   |                                     |
| 9                                 | 1                                   |                                     |                                     |   |                                     |
| 10                                | 1                                   |                                     |                                     |   |                                     |
| 12                                | 1                                   |                                     |                                     |   |                                     |
| 15                                | 1                                   |                                     |                                     |   |                                     |
| Total de IUI en 36 pacientes: 205 |                                     | Total de IVF en 36 pacientes: 17    |                                     | Total de ICSI en 9 pacientes: 6                       |                                     |

## 5.2 RESULTADOS DEL SEMINOGRAMA

### 5.2.1 Aspectos Físico-Químicos

#### 5.2.1.1 Volumen del Líquido Seminal

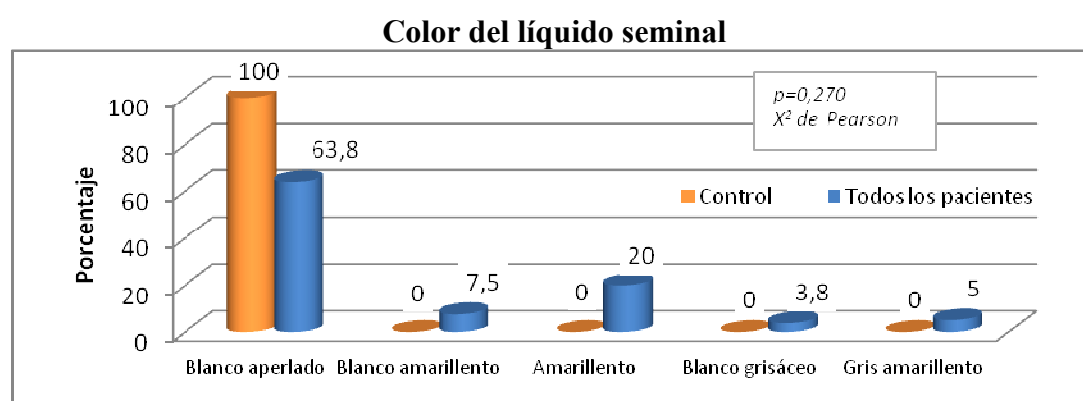
El volumen de líquido seminal fue normal en el 65% de las muestras analizadas, registrándose en el grupo de pacientes, como valor de la media:  $3,47 \pm 2,24$  mL. Comparando esta cifra con la del grupo control ( $4,18 \pm 0,89$  mL) se encontró que la diferencia no fue significativa ( $p=0,325$ ; *t de Student*). Diecisiete casos presentaron un volumen aumentado y sólo en cuatro casos se observó una disminución de la cantidad del líquido seminal. Los valores promedio de volumen seminal por grupo de acuerdo al diagnóstico bacteriológico fueron:  $3,39 \pm 2,18$  mL, para el grupo 1;  $2,95 \pm 0,86$  mL, para el grupo 2;  $3,93 \pm 2,88$  mL, para el grupo 3;  $3,06 \pm 1,47$  mL, para el grupo 4. La comparación de los valores promedio entre grupos no fue significativa ( $p=0,46$ ; *Kruskal-Wallis*). Tabla IVa y Figura 10a.



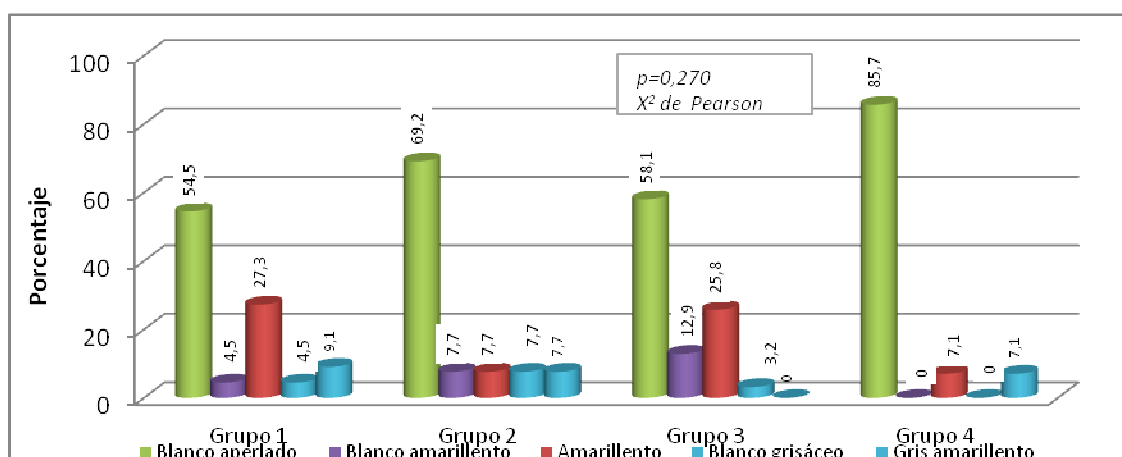
**Figura 10a.** Volumen del líquido seminal de los hombres infértiles incluidos en el estudio

### 5.2.1.2 Color del Líquido Seminal

Como parte del análisis físico de las muestras seminales, se registró el color del espécimen, siendo la tonalidad blanca aperlada el valor más frecuentemente observado, ya que estuvo presente en todos los casos de control y en 51 pacientes (64,6% de los casos). El segundo valor en frecuencia registrado para éste parámetro, fue la tonalidad o coloración amarillenta, que se observó en 26 muestras (36,4%) de pacientes, siendo francamente amarillento en 16 de ellas (80%). La comparación entre los valores para éste rasgo físico-químico, entre el grupo control y el de pacientes, arrojó diferencias no significativas ( $p=0,270$ ;  $\chi^2$  de Pearson) [Tabla IVb y Figura 10b]. No obstante observamos que 23 de los 26 casos en los que se apreció un tono de color amarillento correspondieron a casos de pacientes en los que el diagnóstico microbiológico comprendía la presencia de Mycoplasmas (grupos 1 y 3 de acuerdo a diagnóstico microbiológico). Hemos ilustrado estas observaciones en la Figura 10c y en la Tabla IVb.



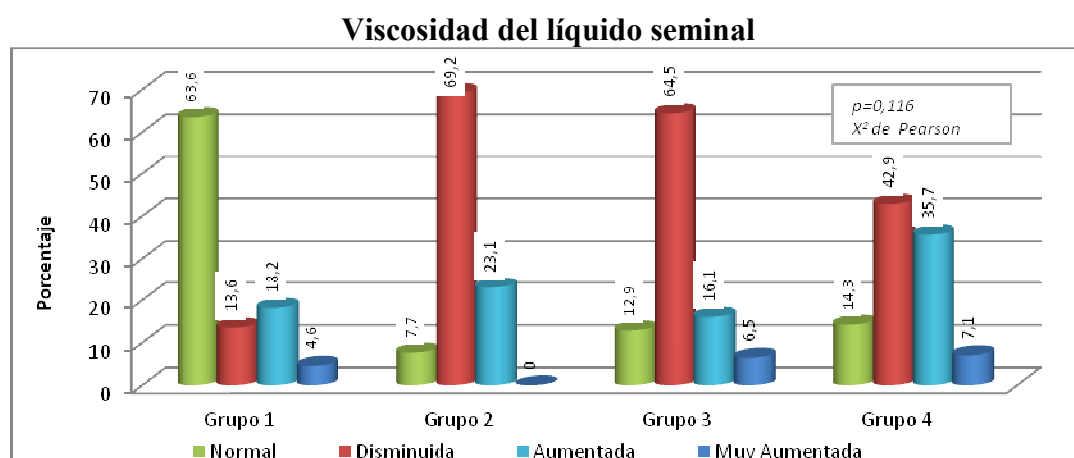
**Figura 10b.** Color del líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre el grupo control y el grupo de pacientes. Porcentaje de casos que presentaron este rasgo.



**Figura 10c.** Color del líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre los grupos según el diagnóstico microbiológico. Porcentaje de casos con este rasgo.

### 5.2.1.3 Viscosidad

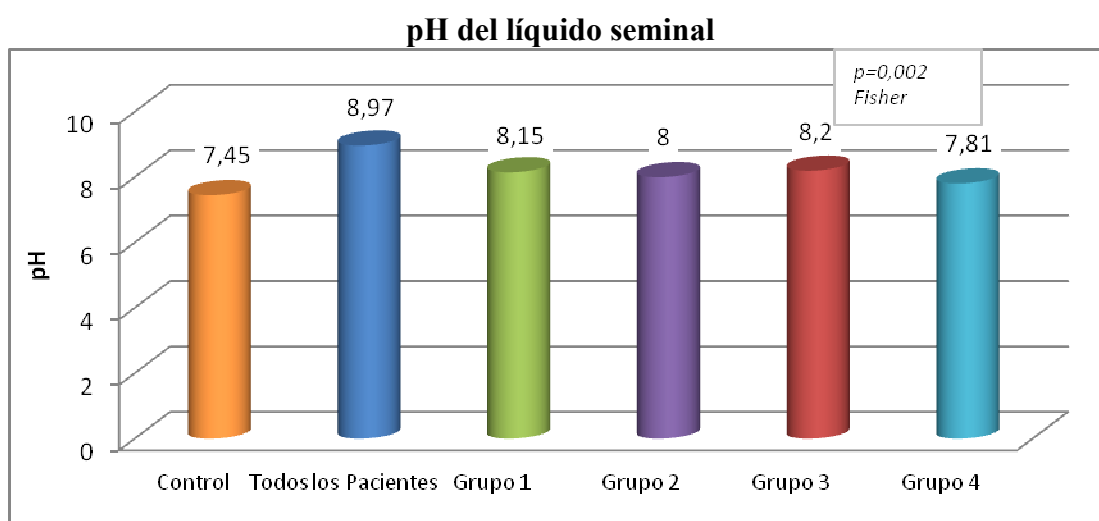
La viscosidad seminal fue normal (goteo lento) en el 100% de los casos del grupo control y en el 61,3% de los casos de pacientes. En éste grupo se presentaron 31 casos (38,8%), de viscosidad anormal: 10 casos (12,5%), de viscosidad disminuida (goteo rápido), 17 casos (21,3%) de viscosidad aumentada (filamentoso) y 4 casos (5%), de hiperviscosidad o viscosidad muy aumentada (ligamentoso). Cuando se compararon las frecuencias de estos valores entre los grupos de acuerdo a diagnóstico bacteriológico (Tabla IVb y Figura 10d), las diferencias no fueron significativas ( $p=0,116$ ;  $\chi^2$  de Pearson), sin embargo destacó que en el grupo 2 con diagnóstico de IGU por *Chlamydia trachomatis* la viscosidad seminal fue anormal en el 92,3% de los casos.



**Figura 10d.** Viscosidad del líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre los grupos según el diagnóstico microbiológico. Porcentaje de casos que presentaron este rasgo.

### 5.2.1.4 pH del Líquido Seminal

De acuerdo a los valores de referencia establecidos por las guías de la WHO (2010), el pH de líquido seminal fue normal en 39 de los pacientes (48,8%), fluctuando entre 7,4 a 8,0. Sin embargo, se registraron valores de alcalinidad de pH 8,0 hasta 8,8 en gran porcentaje de los pacientes: 72,5% correspondiente a 58 casos. Los valores promedio registrados en el grupo de pacientes fueron:  $8,97 \pm 0,34$ . Comparando esta cifra con la del grupo control ( $7,45 \pm 0,14$ ) se encontró que la diferencia no fue significativa ( $p = 0,544$ ; *t de Student*). Bajo otro enfoque, se encontró que en 22 casos de pacientes, el pH del líquido seminal se calificó como muy alcalino (8,4 a 8,8) y 19 de ellos (86,4%) correspondían a infección por Mycoplasmas como germen único (14 casos) o combinado con Clamidia (4 casos). Los valores promedio de pH por grupo de acuerdo al diagnóstico bacteriológico fueron:  $8,15 \pm 0,34$ , para el grupo 1;  $8,0 \pm 0,35$ , para el grupo 2;  $8,20 \pm 0,27$ , para el grupo 3;  $7,81 \pm 0,35$ , para el grupo 4. La comparación de los valores promedio entre grupos, fue estadísticamente significativa ( $p = 0,002$ ; *Kruskal-Wallis*). Tabla IVa y Figura 10e.



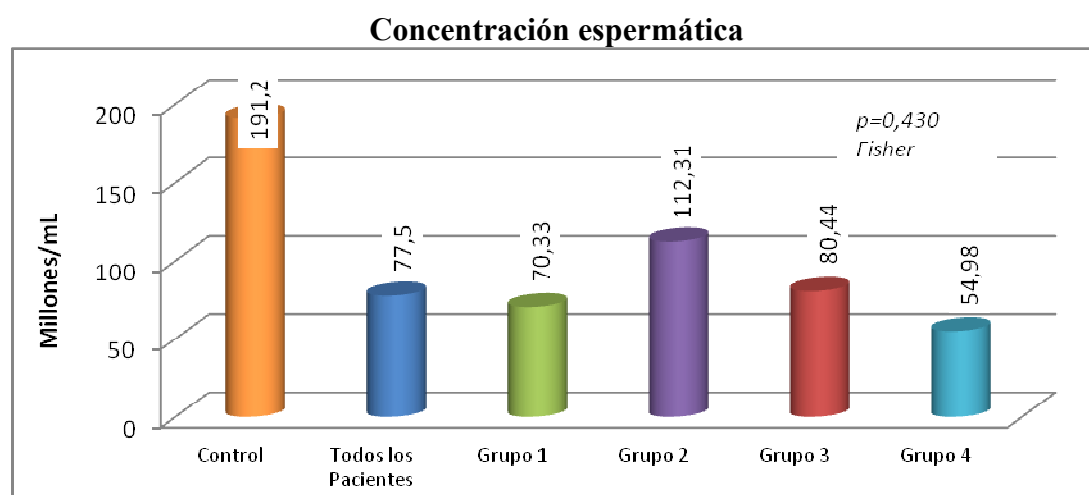
**Figura 10e.** pH del líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre control, todos los pacientes y los grupos atendiendo al diagnóstico microbiológico.

### 5.2.2 Concentración Espermática

El recuento de espermatozoides por mililitro, practicado en cámara de Makler, en el grupo de pacientes fue de  $77,5 \pm 77,19 \times 10^6$ , ( $0,7-495 \times 10^6$ ) y en el grupo control fue de  $191,2 \pm 65,56 \times 10^6$  ( $98-302 \times 10^6$ ). La comparación estadística de éstos valores determinó que la diferencia entre ambos grupos de pacientes y controles fue significativa ( $p \leq 0,0001$ ; *t de Student*). Para el grupo 1, el análisis seminal concluyó una concentración espermática de

$70,33 \pm 44,99 \times 10^6$ , ( $3,0-171 \times 10^6$ ); los pacientes con diagnóstico de IGU y presencia sólo de *Chlamydia trachomatis* en el líquido seminal, presentaron una concentración de  $112,31 \pm 146,47 \times 10^6$ , ( $5,0-495 \times 10^6$ ); los pacientes con diagnóstico de IGU y presencia sólo de *Mycoplasma spp.* en el líquido seminal, presentaron una concentración de  $80,44 \pm 54,02 \times 10^6$ , ( $3,6-208 \times 10^6$ ); para los pacientes del grupo 4, con infección por otros gérmenes distintos a *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.*, el recuento de espermatozoides en el análisis seminal concluyó una concentración espermática de  $54,98 \pm 61,03 \times 10^6$ , ( $0,71851 \times 10^6$ ).

El análisis de las diferencias entre grupos de pacientes por diagnóstico microbiológico para la variable concentración de espermatozoides, no fue significativa ( $p=0,43$ ; Fisher). Tabla Va y Figura 11.

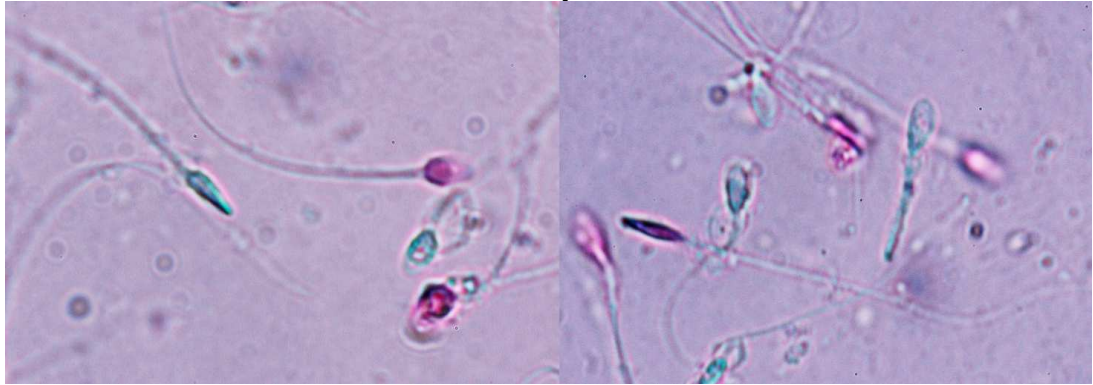


**Figura 11.** Concentración de espermatozoides en millones por mililitro de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre control, todos los pacientes y los grupos atendiendo al diagnóstico microbiológico.

### 5.2.3 Vitalidad Espermática

Uno de los aspectos de la calidad espermática evaluados en éste estudio fue la vitalidad espermática, definida como el porcentaje de espermatozoides que excluyen el colorante supravital (Eosina Y al 1 % en solución salina fisiológica), diagnosticados como “vivos” y el porcentaje de espermatozoides que se tiñen, por incapacidad o falta de eficacia de la membrana citoplásmica, para la exclusión de la Eosina Y (espermatozoides “muertos”). Figura 12a.

### Vitalidad espermática



**Figura 12a.** Vitalidad espermática. Espermatozoides vivos (transparentes y sin contraste); espermatozoides muertos (color rojo). Prueba de Eosina amarilla al 0.1%. Microscopia de campo claro, 100x.

Una vez que la muestra seminal se licuó, se realizó una primera lectura de la vitalidad espermática definida como “en fresco”. En el grupo de pacientes subfértiles, el porcentaje de espermatozoides vivos fue en promedio de  $68,16 \pm 19,28$ , mientras que en el grupo de control, la vitalidad espermática fue de  $88,90 \pm 3,31\%$ . En la comparación de los valores promedio por grupo de acuerdo al diagnóstico microbiológico, las diferencias que se observaron no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,58$ ; Fisher). Los valores promedio de vitalidad espermática para cada grupo de pacientes se presentan en la Tabla Va.

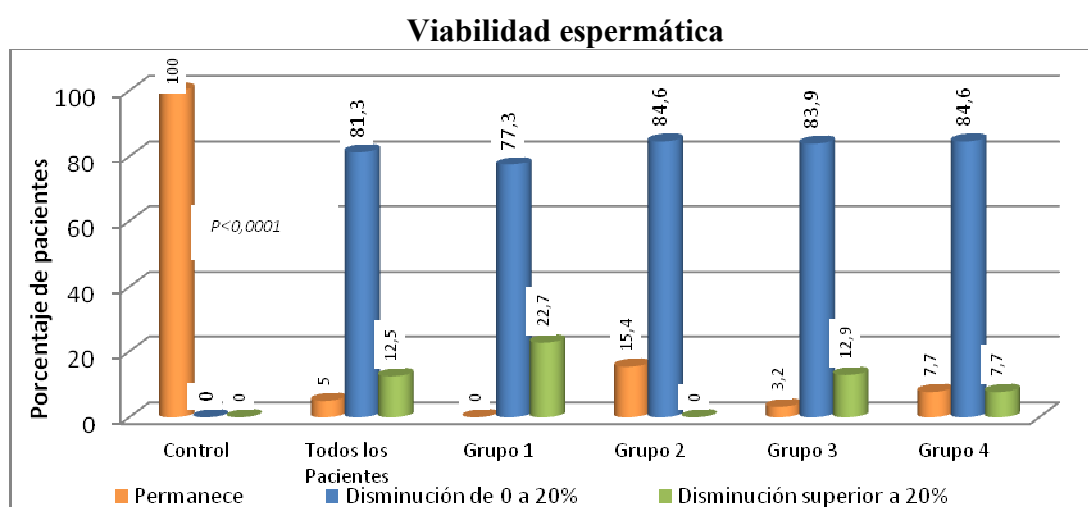
#### 5.2.4 Viabilidad Espermática

Transcurrida una hora del primer análisis de vitalidad espermática, en forma complementaria se realizó una segunda determinación del porcentaje de espermatozoides “vivos”. Se estableció así la viabilidad o sobrevida de los espermatozoides.

Las muestras seminales del grupo de pacientes presentaron un deterioro de la viabilidad espermática del 1 al 20%, en 65 pacientes (81,3%). Éste grado de disminución se registró en el 77,3% de los casos del grupo 1 ( $n=22$ ), en el 84,6% (11 de los 13 casos) del grupo 2, en 83,9% de los casos del grupo 3 (26 de 31) y en 84,6% de los casos del grupo 4 (14). Tabla Vb.

El porcentaje de espermatozoides vivos a la hora, después de la primera lectura de vitalidad, se mantuvo sin deterioro en el grupo control. Las diferencia en el porcentaje de espermatozoides con disminución de la vitalidad espermática del 20%, como máximo, registrados a la hora del primer análisis de vitalidad, comparando el grupo control contra

los pacientes fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Tabla Vb y Figura 12b.



**Figura 12b.** Viabilidad espermática de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Comparaciones entre control, todos los pacientes y los grupos según el diagnóstico microbiológico.

Una disminución mayor al 20% de los espermatozoides vivos a la hora de la primera evaluación se observó en 10 casos del grupo de pacientes (12,5%), 5 de ellos correspondieron a pacientes del grupo 1, 4 casos al grupo 3, y sólo uno pertenecía al grupo 4.

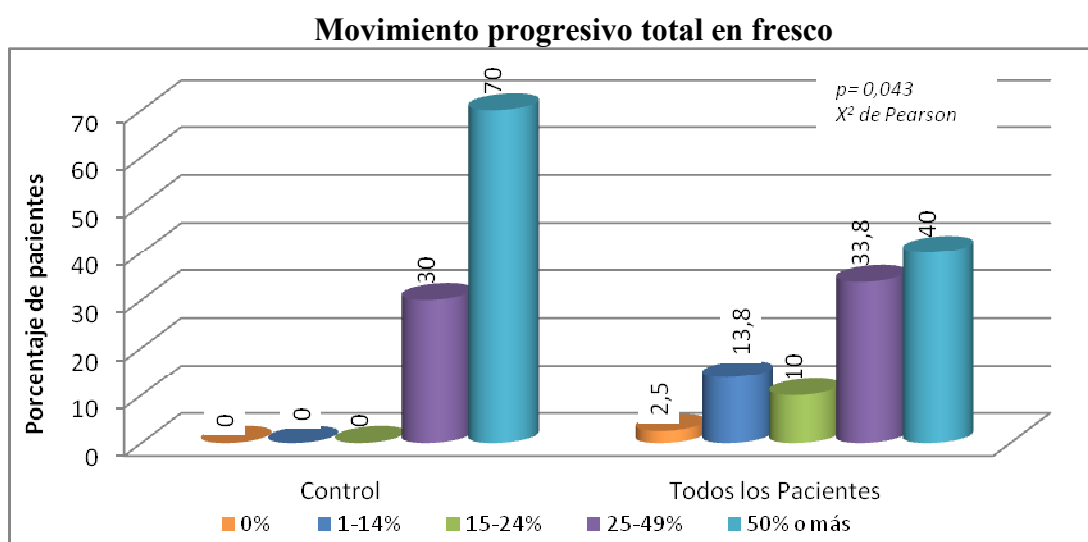
### 5.2.5 Patrón de Motilidad Espermática

El examen del líquido seminal incluyó la evaluación del movimiento de los espermatozoides, estableciéndose el porcentaje total de desplazamiento progresivo y el porcentaje de movimiento progresivo rectilíneo, en fresco a la hora y a las dos horas. De esta forma se pudieron detectar alteraciones que se presentaron o acentuaron en el transcurso de las dos horas subsecuentes a la obtención de la muestra, al permanecer los espermatozoides en el líquido seminal, en contacto con el resto de los componentes celulares y expuestos al ambiente bioquímico y molecular normal o alterado, que formó parte del proceso de infección o el “normal” en los casos de control.

#### 5.2.5.1 Movimiento Progresivo Total en Fresco

En casi el 60% de los hombres subfértiles (48 casos), las evaluaciones seminales realizadas previamente a éste estudio, detectaron astenozoospermia, con porcentajes de

espermatozoides de movimiento progresivo inferiores a los valores recomendados por la WHO como criterios de infertilidad: 50% de movimiento progresivo curvilíneo más movimiento progresivo rectilíneo. Ninguno de los casos del grupo control, presentó cifras anormales de movimiento progresivo total, resultando ser las diferencias de éste parámetro entre el grupo de pacientes y el grupo control estadísticamente significativas ( $p=0,043$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Tabla VI y Figura 13a.



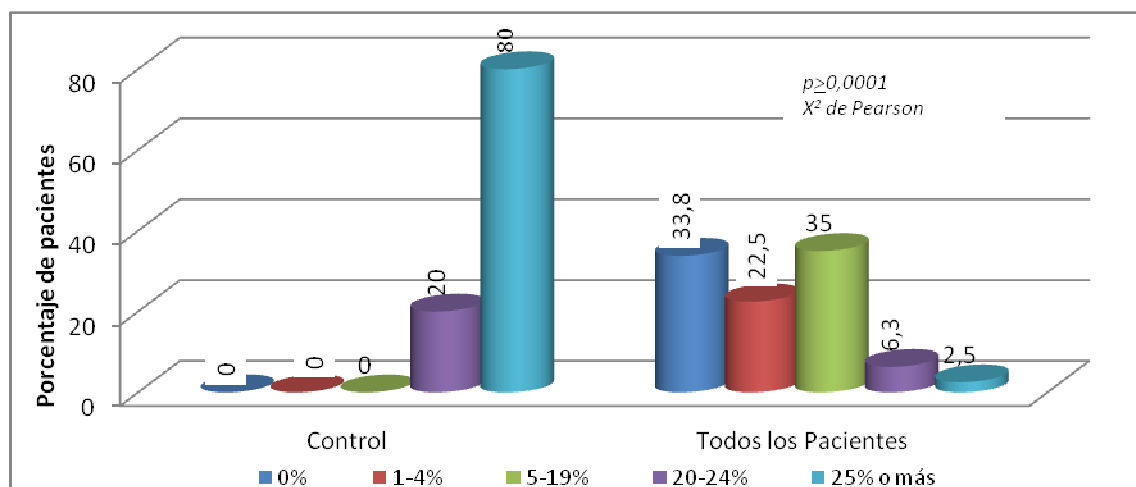
**Figura 13a.** Espermatozoides con movimiento progresivo total en fresco. Comparaciones entre el grupo control y el grupo de pacientes.

### 5.2.5.2 Movimiento Progresivo Rectilíneo en Fresco

Cuando se consideró solamente el patrón de desplazamiento rectilíneo o rápido, el 97,5% de los pacientes infértiles (78 casos), registraron cifras inferiores a las consideradas por la WHO como indicativas de potencial de fertilidad (menos de 25% de espermatozoides con movimiento progresivo rectilíneo); de ellos, más de la mitad presentaron un deterioro severo en éste parámetro seminal, siendo el movimiento rectilíneo inferior al 5%. En el grupo control, sólo dos casos presentaron motilidad progresiva rectilínea disminuida (20-24%), con respecto a los valores considerados como normales y la comparación con el grupo de pacientes fue estadísticamente significativa ( $p \geq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson) [Figura 13b]. Los datos que corresponden a los grupos de acuerdo al diagnóstico microbiológico se presentan en la Tabla VI.



### Movimiento progresivo rectilíneo en fresco.



**Figura 13b.** Espermatozoides con movimiento progresivo rectilíneo en fresco. Comparaciones entre el grupo control y el grupo de pacientes

#### 5.2.5.3 Movimiento Progresivo Total a la Hora

El porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo total, calculado una hora después de la licuefacción seminal, se mantuvo sin cambios significativos y fue normal ( $>50\%$ ) para los casos de control y sólo para 25 (31,25%), de los casos con IGU, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,005$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

El resto de los pacientes (67,5%) presentaron cambios en éste parámetro, después de la incubación del líquido seminal, los cuales consistieron, para 25 casos (31,25%) en un incremento del porcentaje de espermatozoides mayor del 10% y para 22 casos (27,25%) en un deterioro mayor del 10%. En la Tabla VI, la comparación de los datos de acuerdo a diagnóstico bacteriológico se presenta a detalle.

#### 5.2.5.4 Movimiento Progresivo Rectilíneo a la Hora

Una hora después de la licuefacción seminal, el 100% de los casos del grupo control se mantuvo sin cambios en el porcentaje de espermatozoides con movimiento de progresión rectilínea, mientras que el 58,8% de los casos del grupo de pacientes presentaron un cambio en ese patrón de motilidad mayor del 10%, siendo la diferencia en estos porcentajes de significancia estadística ( $p=0,002$ ;  $\chi^2$  de Pearson). En la Tabla VI, la comparación de los datos de acuerdo a diagnóstico bacteriológico se presenta a detalle.

### 5.2.5.5 Movimiento Progresivo Total a las Dos Horas

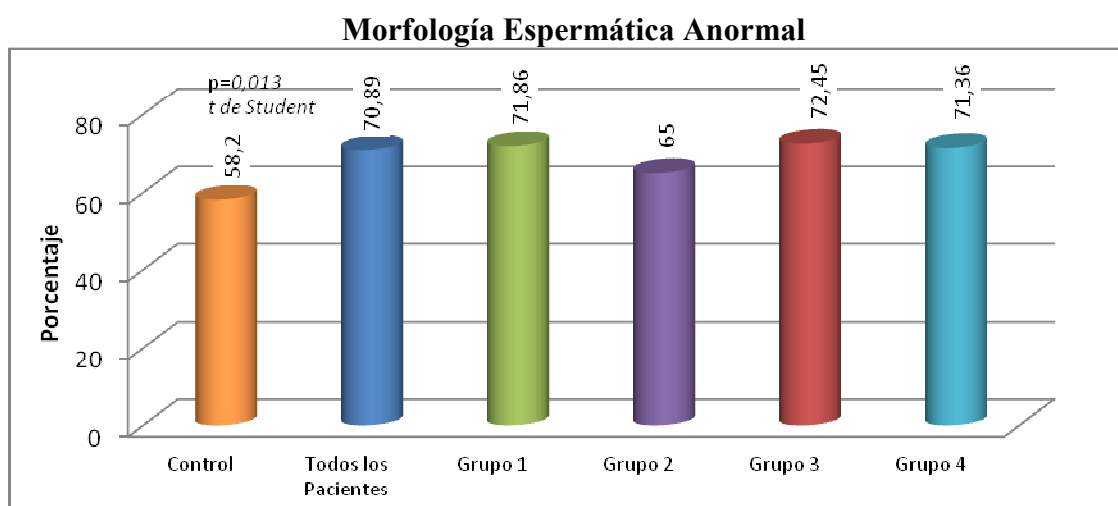
El porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo total, calculado dos horas después de la licuefacción seminal, se mantuvo sin cambios para todos los casos de control y sólo para 23 de los casos (28,75%), con IGU. Con respecto a la lectura de motilidad hecha una hora antes de ésta, las muestras seminales de los pacientes presentaron una disminución de más del 10% de espermatozoides con motilidad total progresiva en 40 casos (50%) y el 21,3% (17 casos) presentaron un incremento de más del 10% de éste valor. En el análisis estadístico de estas diferencias entre grupo control y grupo de pacientes, se comprobó que son estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

### 5.2.5.6 Movimiento Progresivo Rectilíneo a las Dos Horas

Dos horas después de la licuefacción seminal, el 20% de los casos del grupo control y el 65% de los casos del grupo de pacientes, presentaron cambios en el porcentaje de espermatozoides con movimiento de progresión rectilínea. Permanecieron sin cambio en éste parámetro 28 casos del grupo de pacientes (35%). En éste grupo 32 casos (40%) presentaron una disminución en ese patrón de motilidad mayor del 10% y 20 casos (25%) presentaron un incremento mayor del 10%. Las diferencias en estos porcentajes presentaron significación estadística ( $p= 0,012$ ;  $\chi^2$  de Pearson). En la Tabla VI, la comparación de los datos de acuerdo a diagnóstico bacteriológico se presenta a detalle.

### 5.2.6 Morfología Espermática

El porcentaje de espermatozoides de forma normal y anormal se determinó en frotis de líquido seminal teñidos por el método Papanicolaou, encontrando que en el grupo control el valor promedio del porcentaje de espermatozoides anormales fue de  $58,2 \pm 5$ , mientras que en el grupo de pacientes fue de  $70,89 \pm 15,62$ , siendo ésta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,013$ ;  $t$  de Student). En el análisis por grupo de acuerdo a diagnóstico bacteriológico, se encontraron  $71,86 \pm 16,73$ , para el grupo 1;  $65 \pm 10,61$ , para el grupo 2;  $72,45 \pm 16,33$ , para el grupo 3 y  $71,36 \pm 16,4$ , para el grupo 4. Las diferencias de estos porcentajes no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,23$ ;  $t$  de Student). Tabla VIIa y Figura 14a.



**Figura 14a.** Espermatozoides con morfología espermática anormal. Comparaciones entre control, todos los pacientes y los grupos atendiendo al diagnóstico microbiológico.

### 5.2.6.1 Patrón de Alteraciones Morfológicas

A continuación se describen los tipos de anomalías de la forma de los espermatozoides registradas para el grupo control y de pacientes en forma global, así como por grupos de acuerdo al diagnóstico microbiológico.

### 5.2.6.2 Alteraciones Nucleares

El porcentaje de espermatozoides con alteración nuclear fue de  $5.5 \pm 3.14$  para el grupo control, mientras que en los pacientes fue de  $15.14 \pm 13.73$ , estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p \leq 0.0001$ ; *t de Student*). El resultado del análisis estadístico aplicado a los valores porcentuales en los grupos analizados, no presentó diferencia significativas ( $p=0.230$ ; *Fisher*), y solo se observó mayor número de espermatozoides con esta alteración morfológica en los grupos 1 y 3. Tabla VIIa.

La alteración nuclear más frecuente en el grupo de pacientes fue la presencia de vacuolas intranucleares, cuyo porcentaje (38,75%), fue mayor que en el grupo control (20%). Esta diferencia fue estadísticamente significativa cuando se compararon controles y pacientes ( $p \leq 0.0001$ ;  $\chi^2$  de *Pearson*).

Del total de 31 casos de pacientes que presentaron espermatozoides con vacuolación del núcleo, 11 (35,48%) pertenecieron al grupo 1, 2 (6,45%) al grupo 2, 18 (58,06%) para el grupo 3 y ningún caso de grupo 4 presentó vacuolas intranucleares. Formas de espermatozoide con proyecciones apicales de la cabeza fueron vistos en segundo lugar de

frecuencia en el grupo de pacientes (26,25%). Otras alteraciones de la morfología nuclear apreciadas con menos frecuencia en los pacientes con IGU fueron: descompactación cromatínica, macronúcleos, micronúcleos y binucleación. En los controles sólo se observó 30% de casos con proyecciones apicales, el resto de las variables no mostró diferencias numéricas. El análisis estadístico aplicado a esta variable cualitativa mostró diferencias significativas entre los 4 grupos de pacientes analizados, obteniendo un valor de  $p \leq 0,0001$  ( $\chi^2$  de Pearson). Tabla VIIb y Figura 14b.

#### 5.2.6.3 Alteraciones del Acrosoma

Los espermatozoides con alteración del acrosoma reportados en el grupo control ( $3,0 \pm 2,67$ ) fue menor al encontrado en el grupo de pacientes ( $12,99 \pm 10,43\%$ ) estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p \leq 0,0001$ ; *t de Student*). Los grupos analizados en función del diagnóstico microbiológico no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,400$ ; *Fisher*). Tabla VIIa.

La alteración más frecuente del acrosoma en el grupo de pacientes fue la presencia de acrosoma disminuido, cuyo porcentaje (73,75%), fue mayor que la reportada en el grupo control (40%). Esta diferencia fue estadísticamente significativa cuando se compararon controles y pacientes ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

Del total de los 59 casos de pacientes que presentaron disminución del acrosoma, 18 (30,51%) pertenecieron al grupo 1, 9 (15,25%) al grupo 2, 19 (32,02%) para el grupo 3 y 13 (22,22%) del grupo 4.

La ausencia de acrosoma fue vista en segundo lugar de frecuencia en el grupo de pacientes (23,75%). Otras alteraciones de la morfología del acrosoma apreciadas en menor porcentaje de pacientes con IGU fueron: tamaño aumentado y vacuolación del acrosoma, las cuales no mostraron diferencias numéricas. El análisis estadístico aplicado a esta variable cualitativa no reportó diferencias significativas entre los 4 grupos de pacientes analizados, obteniendo un valor de  $p = 0,317$  ( $\chi^2$  de Pearson). Tabla VIIb y Figura 14b.

#### 5.2.6.4 Alteraciones de la Pieza Media del Flagelo

Los espermatozoides con pieza media alterada reportados en el grupo control ( $2,6 \pm 2,91$ ) fue menor que el observado en el grupo de pacientes ( $15,93 \pm 15,46\%$ ) estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p \leq 0,0001$ ; *t de Student*). Los

porcentajes obtenidos en los grupos en base a el diagnóstico microbiológico no presentaron diferencias significativas ( $p=0,700$ ; *Fisher*). Tabla VIIa.

Las alteraciones más frecuentes de la pieza media en el grupo de pacientes fueron la presencia de la pieza media doblada (41,2%) y el engrosamiento de la pieza media (40,0%). En el grupo control no se observaron espermatozoides con estas anomalías. El análisis estadístico aplicado para ambos rasgos citológicos, no mostró diferencias significativas ( $p\leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de *Pearson*).

Para éste segmento del flagelo, la presencia de plegamiento de la pieza media estuvo también presente con una frecuencia importante. Esta anomalía se observó en 33 casos (41,25%) de los pacientes, perteneciendo 4 (12,2%) al grupo 1, 8 (24,24%) al grupo 2, 11 (33,33%) al grupo 3 y 10 casos (30,3%) al grupo 4. En el grupo control se presentó un sólo caso con esta alteración.

Una cantidad de citoplasma que se consideró excesivo en la pieza media del flagelo estuvo presente en 14 casos (17,5%) de los pacientes, de los cuales 5 (35,71%) pertenecieron al grupo 1, 2 (14,29%) al grupo 2, 5 (35,71%) al grupo 3 y 2 casos (14,29%) al grupo 4. El grupo control presentó un 40,0% de pacientes con esta alteración morfológica. El análisis estadístico aplicado a esta variable cualitativa no mostró diferencias significativas entre los 4 grupos de pacientes analizados, obteniendo un valor de  $p=0,167$  ( $\chi^2$  de *Pearson*). Tabla VIIb y Figura 14b.

#### 5.2.6.5 Alteraciones de la Pieza Principal

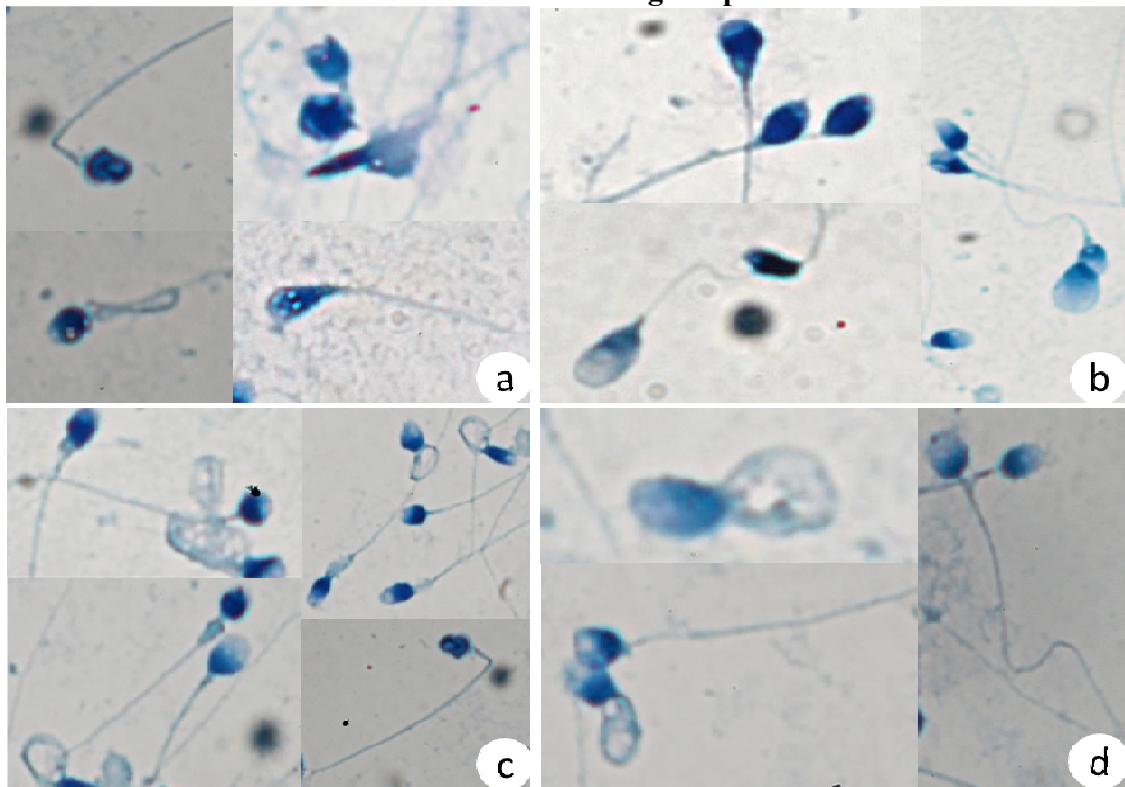
El porcentaje de espermatozoides con pieza principal alterada mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p\leq 0,0001$ ; *t de Student*) entre pacientes y controles, con valores de  $17,64\pm 13,06\%$  y  $1,0\pm 2,11\%$ , respectivamente. Los porcentajes calculados en los grupos de acuerdo al diagnóstico microbiológico no presentaron diferencias significativas ( $p=0,170$ ; *Fisher*), solo se observó un incremento de este valor en el grupo 3. Tabla VIIa.

La pieza principal enrollada se observó en un alto porcentaje de los pacientes (88,75%), mientras que en los controles no se pusieron de manifiesto casos con este rasgo citológico. El análisis estadístico aplicado entre controles y pacientes no mostró diferencias significativas ( $p\leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de *Pearson*).

La presencia de flagelos enrollados en los 71 casos de pacientes, se distribuyó de la siguiente manera en los grupos de acuerdo al diagnóstico bacteriológico: 18 (25,35%) del

grupo 1, 13 (18,31%) del grupo 2, 29 (40,85%) del grupo 3 y 11 casos (15,49%) del grupo 4 presentaron este hallazgo. No se observó ningún caso con enrollamiento de la pieza media en el grupo control. Otras alteraciones de la pieza principal del flagelo, que se presentaron con menor frecuencia en los pacientes con IGU fueron: flagelo engrosado, flagelo corto y flagelo doblado. En el análisis estadístico realizado no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos de pacientes analizados, obteniendo un valor de  $p=0,103$  ( $\chi^2$  de Pearson). Tabla VIIb y Figura 14b.

#### Alteraciones de la Morfología espermática



**Figura 14b.** Alteraciones de la morfología espermática. **a.** alteraciones nucleares: núcleos vacuolados, elongados y cromatina descompactada. **b.** Defectos del acrosoma del espermatozoide: acrosomas disminuidos, aumentados y vacuolados. **c.** Defectos de la pieza media: Espermatozoides con piezas medias engrosadas, doblada y excesivo citoplasma residual. **d.** Defectos de la pieza principal: espermatozoides con flagelos enrollados y doblados. Tinción de Papanicolaou, 100x, Campo Claro.

**Tabla IVa.** Resultados del seminograma. Parámetros fisicoquímicos de líquido seminal de los pacientes incluidos en el estudio.

| Control<br>n=10 |     |     |     |     | Todos los Pacientes<br>n=80 |     |     |     |     | Grupo 1<br>n=22 |     |     |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|
|                 | X   | DS  | Min | Max | X                           | DS  | Min | Max | X   | DS              | Min | Max |
| <b>Volumen</b>  | 4,8 | 0,9 | 2,9 | 5,1 | 3,5                         | 2,2 | 0,1 | 9,9 | 3,4 | 2,2             | 1,1 | 9,9 |
| <b>pH</b>       | 7,5 | 0,1 | 7,2 | 7,6 | 9,0                         | 0,3 | 7,4 | 8,8 | 8,2 | 0,3             | 7,5 | 8,8 |
| Grupo 2<br>n=13 |     |     |     |     | Grupo 3<br>n=31             |     |     |     |     | Grupo 4<br>n=14 |     |     |
| <b>Volumen</b>  | 3,0 | 0,9 | 1,7 | 4,9 | 3,9                         | 2,9 | 1,9 | 18  | 3,1 | 1,5             | 0,1 | 1,6 |
| <b>pH</b>       | 8   | 0,4 | 7,5 | 8,7 | 8,2                         | 0,3 | 7,5 | 8,7 | 7,8 | 0,4             | 7,4 | 8,7 |

**Tabla IVb.** Parámetros fisicoquímicos de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

|                           | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Color del semen</b>    |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Blanco aperlado           | 10(100)                  | 51(63,8)                              | 12(54,3)                | 9(69,2)                 | 18(58,1)                | 12(85,7)                |
| Blanco amarillento        | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 4(12,9)                 | 0(0)                    |
| Amarillento               | 0(0)                     | 16(20)                                | 6(27,3)                 | 1(7,7)                  | 8(25,8)                 | 1(7,1)                  |
| Blanco grisáceo           | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Gris amarillento          | 0(0)                     | 4(5)                                  | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| <b>Viscosidad seminal</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Normal                    | 10(100)                  | 49(61,3)                              | 14(63,6)                | 1(7,7)                  | 4(12,9)                 | 2(14,3)                 |
| Anormal                   | 0(0)                     | 31(38,8)                              | 8(36,4)                 | 12(92,3)                | 27(87,1)                | 12(85,7)                |
| Disminuida                | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 3(13,6)                 | 9(69,2)                 | 20(64,5)                | 6(42,9)                 |
| Aumentada                 | 0(0)                     | 17(21,3)                              | 4(18,2)                 | 3(23,1)                 | 5(16,1)                 | 5(35,7)                 |
| Muy aumentada             | 0(0)                     | 4(5)                                  | 1(4,6)                  | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |

**Tabla Va.** Parámetros fisicoquímicos de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Concentración (Conc) y vitalidad espermática (Vit).

| Control<br>n=10 |       |       |       |     |     | Todos los Pacientes<br>n=80 |      |      |     |     | Grupo 1<br>n=22 |      |      |     |     |
|-----------------|-------|-------|-------|-----|-----|-----------------------------|------|------|-----|-----|-----------------|------|------|-----|-----|
|                 | X     | DS    | Me    | Min | Max | X                           | DS   | Me   | Min | Max | X               | DS   | Me   | Min | Max |
| Conc            | 191,2 | 65,6  | 195,5 | 98  | 302 | 77,7                        | 77,2 | 60,5 | 0,7 | 495 | 70,3            | 49,0 | 61   | 3   | 171 |
| Vit             | 88,9  | 3,3   | 89,5  | 83  | 95  | 68,2                        | 19,3 | 73   | 5   | 94  | 73,1            | 15,4 | 74   | 21  | 93  |
| Grupo 2<br>n=13 |       |       |       |     |     | Grupo 3<br>n=31             |      |      |     |     | Grupo 4<br>n=14 |      |      |     |     |
|                 | X     | DS    | Me    | Min | Max | X                           | DS   | Me   | Min | Max | X               | DS   | Me   | Min | Max |
| Conc            | 112,3 | 146,5 | 54    | 5   | 495 | 80,4                        | 54,0 | 75   | 3,6 | 208 | 55,0            | 61,0 | 17   | 0,7 | 185 |
| Vit             | 72,2  | 9,9   | 75    | 56  | 88  | 66,6                        | 19,8 | 71   | 5   | 93  | 60,1            | 27,4 | 72,5 | 9   | 94  |

**Tabla Vb.** Parámetros fisicoquímicos de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio. Viabilidad espermática.

|  | Control<br>n=10<br>n(%) | Total de pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
|--|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Vitalidad espermática a la hora</b> |                         |                                    |                         |                         |                         |                         |
| <b>Permanece</b>                       | 10(100)                 | 4(5)                               | 0(0)                    | 2(15,4)                 | 1(3,2)                  | 1(7,7)                  |
| <b>Disminución de 0 a 20%</b>          | 0(0)                    | 65(81,3)                           | 17(77,3)                | 11(84,6)                | 26(83,9)                | 11(84,6)                |
| <b>Disminución superior a 20%</b>      | 0(0)                    | 10(12,5)                           | 5(22,7)                 | 0(0)                    | 4(12,9)                 | 1(7,7)                  |
| <b>Perdidos</b>                        | 0(0)                    | 1(1,3)                             | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,7)                  |

**Tabla VI.** Patrón de motilidad espermática de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

|  | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
|--|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Movimiento progresivo total en fresco</b>           |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>0%</b>  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>1-14%</b>   | 0(0)                     | 11(13,8)                              | 3(13,6)                 | 5(38,5)                 | 0(0)                    | 3(21,4)                 |
| <b>15-24%</b>  | 0(0)                     | 8(10,0)                               | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 5(35,7)                 |
| <b>25-49%</b>  | 3(30)                    | 27(33,8)                              | 6(27,3)                 | 5(38,5)                 | 13(41,9)                | 3(21,4)                 |
| <b>50% o más</b>                                       | 7(70)                    | 32(40)                                | 12(54,5)                | 2(15,4)                 | 15(48,4)                | 3(21,4)                 |
| <b>Motilidad progresiva rectilínea</b>                 |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>0%</b>  | 0(0)                     | 27(33,8)                              | 6(27,3)                 | 6(46,2)                 | 9(29)                   | 6(42,9)                 |
| <b>1-4%</b>  | 0(0)                     | 18(22,5)                              | 6(27,3)                 | 0(0)                    | 8(25,8)                 | 4(28,6)                 |
| <b>5-19%</b>   | 0(0)                     | 28(35)                                | 8(36,4)                 | 6(46,2)                 | 12(38,7)                | 2(14,3)                 |
| <b>20-24%</b>  | 2(20)                    | 5(6,3)                                | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| <b>25% o más</b>                                       | 8(80)                    | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Motilidad progresiva total a la hora</b>            |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>Permanece</b>                                       | 10(100)                  | 25(31,25)                             | 7(31,8)                 | 5(38,5)                 | 10(32,3)                | 3(21,4)                 |
| <b>Mejora en más del 10%</b>                           | 0(0)                     | 32(40)                                | 7(31,8)                 | 4(30,8)                 | 13(41,9)                | 8(57,1)                 |
| <b>Disminuye en más del 10%</b>                        | 0(0)                     | 22(27,5)                              | 8(36,4)                 | 4(30,8)                 | 8(25,8)                 | 2(14,3)                 |
| <b>Perdido</b>   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| <b>Motilidad progresiva rectilínea a la hora</b>       |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>Permanece</b>                                       | 10(100)                  | 32(40)                                | 11(50)                  | 5(38,5)                 | 12(38,7)                | 4(28,6)                 |
| <b>Mejora en más del 10%</b>                           | 0(0)                     | 26(32,5)                              | 5(22,7)                 | 3(23,1)                 | 12(38,7)                | 6(42,9)                 |
| <b>Disminuye en más del 10%</b>                        | 0(0)                     | 21(26,3)                              | 6(27,3)                 | 5(38,5)                 | 7(22,6)                 | 3(21,4)                 |
| <b>Perdido</b>   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| <b>Motilidad progresiva total a las dos horas</b>      |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>Permanece</b>                                       | 10(100)                  | 23(28,7)                              | 5(22,7)                 | 3(23,1)                 | 13(41,9)                | 2(14,3)                 |
| <b>Mejora en más del 10%</b>                           | 0(0)                     | 17(21,3)                              | 4(18,2)                 | 4(30,8)                 | 4(12,9)                 | 5(35,7)                 |
| <b>Disminuye más del 10%</b>                           | 0(0)                     | 40(50)                                | 13(59,1)                | 6(46,2)                 | 14(45,2)                | 7(50)                   |
| <b>Motilidad progresiva rectilínea a las dos horas</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>Permanece</b>                                       | 8(80)                    | 28(35)                                | 8(36,4)                 | 6(46,2)                 | 8(25,8)                 | 6(42,9)                 |
| <b>Mejora en más del 10%</b>                           | 2(20)                    | 20(25)                                | 4(18,2)                 | 3(23,1)                 | 11(35,5)                | 2(14,3)                 |
| <b>Disminuye más del 10%</b>                           | 0(0)                     | 32(40)                                | 10(45,5)                | 4(30,8)                 | 12(38,7)                | 6(42,9)                 |



**Tabla VIIa.** Morfología espermática alterada en los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

|   | Control<br>n= 10<br>n(%) |     | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) |      | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) |      | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) |      | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) |      | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |      |
|---|--------------------------|-----|---------------------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|------|
|   | X                        | DS  | X                                     | DS   | X                       | DS   | X                       | DS   | X                       | DS   | X                       | DS   |
| <b>Anormales</b>                        | 58,2                     | 5,1 | 70,9                                  | 15,6 | 71,9                    | 16,7 | 65                      | 10,6 | 72,5                    | 16,3 | 71,4                    | 16,4 |
| <b>Alteración nuclear</b>               | 5,5                      | 3,1 | 15,2                                  | 13,7 | 20,4                    | 17,7 | 11                      | 8,7  | 16,7                    | 13,7 | 7,9                     | 3,9  |
| <b>Alteración acrosomal</b>             | 3                        | 2,7 | 13,0                                  | 10,4 | 15                      | 10,7 | 12,5                    | 11,8 | 11,4                    | 10,3 | 13,8                    | 9,4  |
| <b>Alteración de pieza media</b>        | 2,6                      | 2,9 | 15,9                                  | 15,5 | 14,9                    | 10,3 | 15,1                    | 8,7  | 18,7                    | 21,7 | 12,3                    | 9,6  |
| <b>Alteración de la pieza principal</b> | 1                        | 2,1 | 17,6                                  | 13,1 | 15,8                    | 13,5 | 14,4                    | 7,3  | 22,2                    | 15,6 | 13,4                    | 6,7  |

**Tabla VIIb.** Frecuencia de alteraciones morfológicas de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

|   | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
|---|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Alteraciones nucleares</b>                         |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>No se observa</b>                                  | 2(20)                    | 0(0)                                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Vacuoladas</b>                                     | 2(20)                    | 31(38,7)                              | 11(35,5)                | 2(6,5)                  | 18(58)                  | 0(0)                    |
| <b>Descompactación cromatínica</b>                    | 2(20)                    | 8(10)                                 | 1(12,5)                 | 0(0)                    | 4(50)                   | 3(37,5)                 |
| <b>Elongado</b>                                       | 3(30)                    | 58(6,2)                               | 6(28,6)                 | 8(38,1)                 | 5(23,8)                 | 2(9,5)                  |
| <b>Macronucleos</b>                                   | 0(0)                     | 21(26,2)                              | 2(40)                   | 0(0)                    | 2(40)                   | 1(20)                   |
| <b>Micronucleos</b>                                   | 1(10)                    | 14(17,5)                              | 1(7,1)                  | 3(21,4)                 | 2(14,2)                 | 8(57,1)                 |
| <b>Binucleación</b>                                   | 0(0)                     | 1(1,2)                                | 1(100)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Alteraciones del acrosoma</b>                      |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>No se observa</b>                                  | 4(40)                    | 0(0)                                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Aumentado</b>                                      | 2(20)                    | 1(1,2)                                | 1(100)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Disminuido</b>                                     | 4(40)                    | 59(73,7)                              | 18(30,5)                | 9(15,2)                 | 19(32,2)                | 13(22)                  |
| <b>Vacuolado</b>                                      | 0(0)                     | 1(1,2)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(100)                  | 0(0)                    |
| <b>Ausencia de acrosoma</b>                           | 0(0)                     | 19(23,7)                              | 3(15,8)                 | 4(21)                   | 11(57,9)                | 1(5,2)                  |
| <b>Alteraciones de la pieza media del flagelo</b>     |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>No se observa</b>                                  | 5(50)                    | 1(1,2)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(100)                  | 0(0)                    |
| <b>Engrosada</b>                                      | 0(0)                     | 32(40)                                | 13(40,6)                | 3(9,4)                  | 14(43,7)                | 2(6,2)                  |
| <b>Doblada</b>  | 1(10)                    | 33(41,2)                              | 4(12,2)                 | 8(24,2)                 | 11(33)                  | 10(30,3)                |
| <b>Excesivo citoplasma residual</b>                   | 4(40)                    | 14(17,5)                              | 5(35,7)                 | 2(14,3)                 | 5(35,7)                 | 2(14,3)                 |
| <b>Alteraciones de la pieza principal del flagelo</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>No se observa</b>                                  | 8(80)                    | 1(1,2)                                | 1(100)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Engrosada</b>                                      | 0(0)                     | 4(5)                                  | 2(50)                   | 0(0)                    | 2(50)                   | 0(0)                    |
| <b>Corta</b>  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(100)                  |
| <b>Doblada</b>  | 2(20)                    | 1(1,2)                                | 1(100)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Enrollada</b>                                      | 0(0)                     | 71(88,7)                              | 18(25,3)                | 13(18,3)                | 29(40,8)                | 11(15,5)                |

### **5.2.7 Cambios Citológicos de Tipo Inflamatorio**

#### **5.2.7.1 Presencia de *Detritus* Celulares**

La observación de fragmentos o *detritus* celulares en el líquido seminal fue un rasgo constantemente observado en los pacientes con infección, considerándose su presencia en cantidad moderada en 16 casos (17,8%) y abundante en 30 casos (37,5%). Solamente en el 5% (4 casos) de las muestras seminales no se observaron restos celulares. Para los grupos de pacientes, de acuerdo a diagnóstico bacteriológico, se encontró que la presencia de restos celulares, en cantidad moderada a abundante, fue más notoria en el grupo 3 (100% de los casos), seguido del grupo 2 (73,7% de los casos) y después del grupo 4 (70,3% de los casos). Tabla VIIIa y Figura 15.

#### **5.2.7.2 Presencia de Células Epiteliales**

El estudio microscópico en fresco del líquido seminal, permitió describir la presencia de células epiteliales exfoliadas de la vía seminífera. La presencia de éste rasgo citológico se calificó por grados y se encontró en cantidad escasa predominantemente: 60 casos del grupo de pacientes (75%) y en los dos únicos casos del grupo de control cuyo examen seminal diagnosticó la presencia de células epiteliales. La concentración de éstas células fue mayor (cantidad moderada) en 9 casos del grupo de pacientes (11,3%) y abundante en cuatro de ellos (5%). La presencia de células epiteliales por grupo de pacientes, de acuerdo al diagnóstico microbiológico se resume en la Tabla VIIIa y Figura 15

#### **5.2.7.3 Presencia de Bacterias**

Sólo en el grupo control la observación microscópica en fresco del líquido seminal, no detectó la presencia de gérmenes. Éste rasgo fue evaluado en 56 de las muestras seminales de pacientes subfértiles, encontrando en el 34,5% de ellos, bacterias en cantidad escasa y en el 25,45% una cantidad abundante de bacterias. Tabla VIIIa y Figura 15.

#### **5.2.7.4 Presencia de Leucocitos**

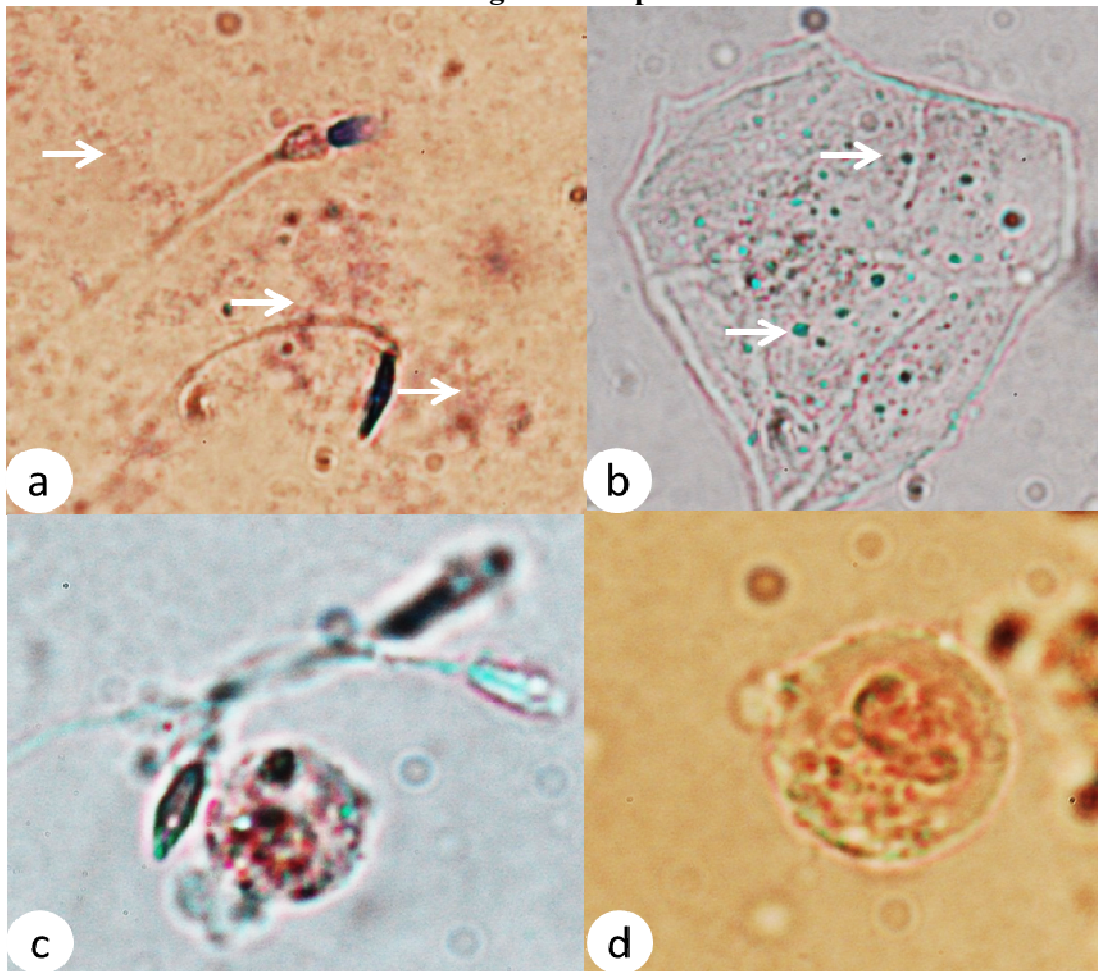
Como parte del examen citomorfológico del líquido seminal, se cuantificó la presencia de leucocitos identificados en base a la positividad a la reacción de inmunoperoxidasa. La concentración de los leucocitos para los casos del grupo control fue de  $0,2 \pm 0,6$ , y para los casos de pacientes fue de  $0,43 \pm 0,46$ . La diferencia entre éstos valores no fue estadísticamente significativa ( $p=0,325$ ; *t de Student*). En la Tabla VIIIb, se

presentan los datos correspondientes a los grupos de pacientes de acuerdo al diagnóstico bacteriológico. Figura 15.

#### 5.2.7.5 Presencia de Fagocitos

La concentración de fagocitos en el líquido seminal se determinó en base a su reacción positiva al rojo neutro. De acuerdo al resultado de esta prueba, la muestra seminal de los casos de control no presentó fagocitos, mientras que la muestra seminal del grupo de pacientes presentó una concentración de  $0,9 \pm 1,75$ . La diferencia entre éstos valores no fue estadísticamente significativa ( $p=0,110$ ; *t de Student*). En la Tabla VIIIb, se presentan éstos datos y los correspondientes a los grupos de pacientes de acuerdo al diagnóstico bacteriológico. Figura 15.

#### Cambios Citológicos de Tipo Inflamatorio.



**Figura 15.** Cambios Citológicos de Tipo Inflamatorio presentes en el líquido seminal de los pacientes incluidos en el estudio. **a.** Detritus celulares (flecha) asociados a espermatozoides. **b.** Célula epitelial con bacterias adheridas (flecha). **c.** Leucocitos peroxidasa positivos. **d.** Fagocitos rojo neutro positivos.

|                            | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Detritus celulares</b>  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>Ausentes</b>            | 10(100)                  | 4(5)                                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 4(12,9)                 | 0(0)                    |
| <b>Escasas</b>             | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 5(22,7)                 | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| <b>Moderadas</b>           | 0(0)                     | 16(20)                                | 6(27,3)                 | 2(15,4)                 | 8(25,8)                 | 0(0)                    |
| <b>Abundantes</b>          | 0(0)                     | 28(35)                                | 8(36,4)                 | 8(61,5)                 | 11(35,5)                | 1(7,1)                  |
| <b>Muy abundantes</b>      | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Perdidos</b>            | 0(0)                     | 20(25)                                | 3(13,6)                 | 3(23,1)                 | 4(12,9)                 | 10(71,4)                |
| <b>Células epiteliales</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>Ausentes</b>            | 8(80)                    | 7(8,8)                                | 2(9,1)                  | 2(15,4)                 | 3(9,7)                  | 0(0)                    |
| <b>Escasas</b>             | 2(20)                    | 60(75)                                | 17(77,3)                | 9(69,2)                 | 21(67,7)                | 13(92,9)                |
| <b>Moderadas</b>           | 0(0)                     | 9(11,3)                               | 3(13,6)                 | 2(15,4)                 | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Abundantes</b>          | 0(0)                     | 4(5)                                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 4(12,9)                 | 0(0)                    |
| <b>Bacterias</b>           |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| <b>Ausentes</b>            | 9(90)                    | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Escasas</b>             | 1(10)                    | 19(23,8)                              | 5(22,7)                 | 4(30,8)                 | 8(25,8)                 | 2(14,3)                 |
| <b>Moderadas</b>           | 0(0)                     | 14(15,5)                              | 5(22,7)                 | 3(23,1)                 | 6(19,4)                 | 0(0)                    |
| <b>Abundantes</b>          | 0(0)                     | 22(27,5)                              | 8(36,4)                 | 2(15,4)                 | 11(35,5)                | 1(7,1)                  |
| <b>Perdidos</b>            | 0(0)                     | 24(30)                                | 4(18,2)                 | 3(23,1)                 | 6(19,4)                 | 11(78,6)                |

|            |      | Control<br>n=10 |     |     |     |      | Todos los Pacientes<br>n=80 |     |     |     |      | Grupo 1<br>n=22 |      |     |     |  |
|------------|------|-----------------|-----|-----|-----|------|-----------------------------|-----|-----|-----|------|-----------------|------|-----|-----|--|
|            | X    | DS              | Me  | Min | Max | X    | DS                          | Me  | Min | Max | X    | DS              | Me   | Min | Max |  |
| Leucocitos | 0,02 | 0,06            | 0,1 | 0   | 0,8 | 0,43 | 1,46                        | 0,6 | 0   | 9,0 | 0,56 | 1,91            | 0    | 0   | 9,0 |  |
| Fagocitos  | 0    | 0               | 0,1 | 0   | 0,2 | 0,9  | 1,75                        | 0,7 | 0   | 6,1 | 0,8  | 1,89            | 0,3  | 0   | 9,0 |  |
|            |      | Grupo 2<br>n=13 |     |     |     |      | Grupo 3<br>n=31             |     |     |     |      | Grupo 4<br>n=14 |      |     |     |  |
|            | X    | DS              | Me  | Min | Max | X    | DS                          | Me  | Min | Max | X    | DS              | Me   | Min | Max |  |
| Leucocitos | 0,08 | 0,13            | 0   | 0   | 0,4 | 0,15 | 0,28                        | 0   | 0   | 1,2 | 1,16 | 2,45            | 0,2  | 0   | 9,0 |  |
| Fagocitos  | 0,69 | 1,63            | 0,3 | 0   | 6,1 | 0,84 | 1,3                         | 0,3 | 0   | 4,7 | 1,36 | 2,48            | 0,25 | 0   | 9,0 |  |

### 5.3 RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL CORTE SEMIFINO CON AZUL DE TOLUIDINA E IFD CONTRA *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

El estudio del corte semifino, del concentrado de las células contenidas en el líquido seminal de pacientes con IGU y de controles, permitió describir los cambios citomorfológicos asociados a la infección. Se hizo una comparación de la presencia o ausencia y el grado o acentuación de cada característica entre el grupo de pacientes y el grupo control, y además, tomando en cuenta el diagnóstico microbiológico inicial; ya descritos en el capítulo anterior.

Una vez que se implementó la prueba de IFD con anticuerpos monoclonales contra la MOMP de *Chlamydia trachomatis*, para su aplicación al corte semifino desplastificado, se registró la presencia de los cuerpos elementales y de los cuerpos reticulares característicos del ciclo de desarrollo de la bacteria comparando el diagnóstico hecho en base a las características morfológicas en el semifino teñido con azul de toluidina, con la presencia de fluorescencia específica en la IFD del semifino. La figura 16a muestra comparativamente ambas imágenes.

Para algunos de los rasgos citomorfológicos se hizo un análisis comparativo adicional, de acuerdo al resultado de la prueba IFD en el corte semifino integrando los pacientes en dos grupos: Grupo Positivo para prueba de IFD en el semifino (IFD positivo) correspondiente a 47 casos y Grupo Negativo para la prueba de IFD en el semifino (IFD negativo) que incluyó 33 pacientes.

#### 5.3.1 *Datos de Inflamación*

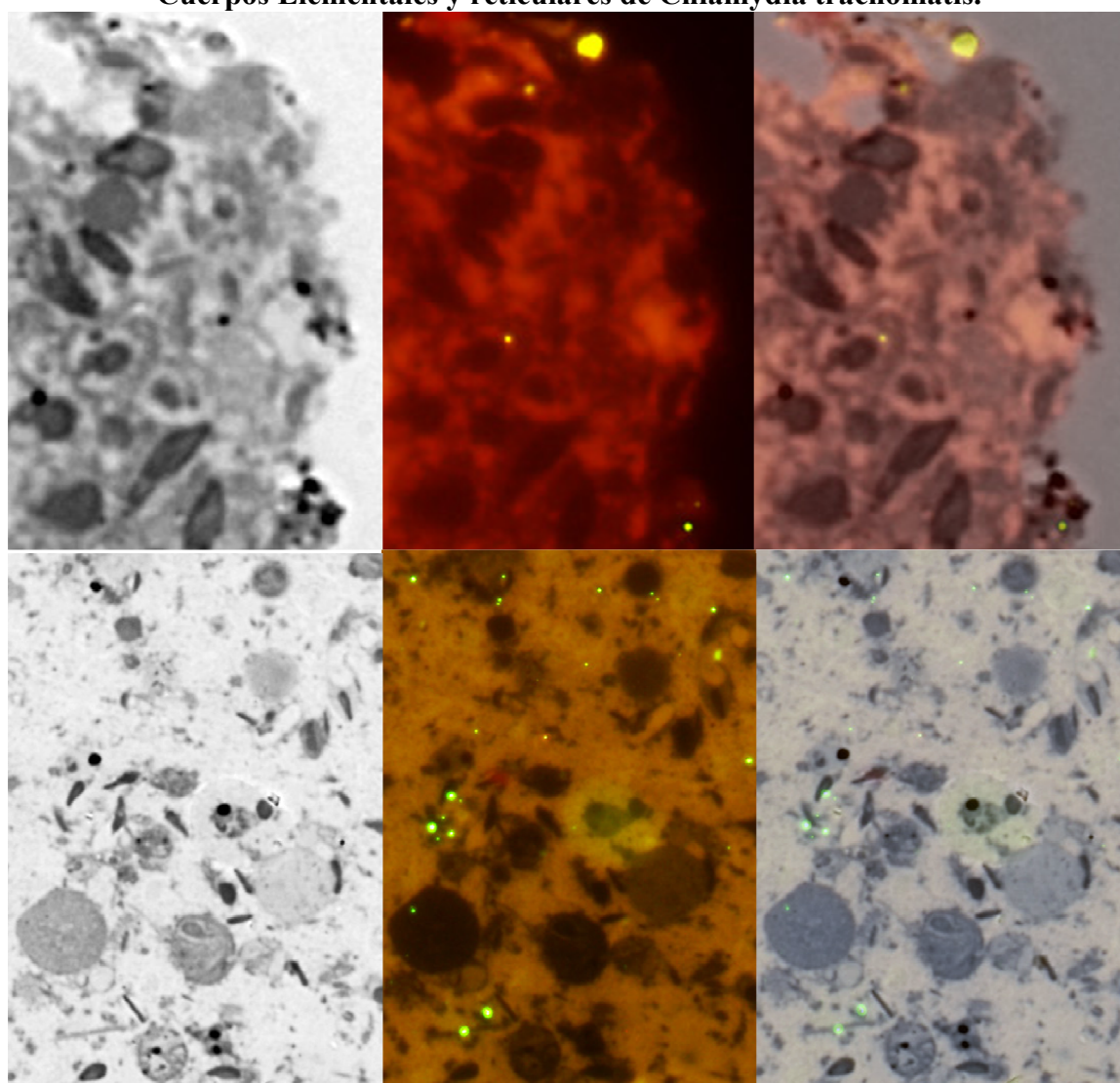
La presencia de células inflamatorias destacó como uno de los rasgos citológicos sobresalientes en el estudio del corte semifino, ya que en la gran mayoría de los pacientes se observaron células fagocíticas con formaciones pseudopódicas, citoplasma vacuolado, con inclusiones bacterianas y se presentaron signos de autólisis con frecuencia (Figura 16b).

##### 5.3.1.1 Presencia de Leucocitos

En el examen microscópico de las secciones semifinas de la muestra seminal en los pacientes infectados, se encontraron abundantes leucocitos polimorfonucleares, los cuales se disponían en acúmulos alrededor de *detritus* celulares asociados a bacterias y también en la vecindad de espermatozoides, y de otras células germinales inmaduras. Se detectó la

presencia de leucocitos en el 20% de los 80 pacientes evaluados: 11,3% con cantidad escasa (1 a 2 por campo microscópico), 3,8% con cantidad moderada y 5,1% con cantidad abundante (6 a 10 por campo microscópico) o muy abundante (más de 10 por campo microscópico), lo que se destacó en un mayor porcentaje de los casos de los grupos 3 y 4: 22,4 y 28,6% respectivamente. En ninguno de los casos del grupo control se observaron leucocitos, pero la diferencia contra el grupo de pacientes no fue significativa para este rasgo citológico ( $p=0,657$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Tabla IXa.

### Cuerpos Elementales y reticulares de *Chlamydia trachomatis*.



**Figura 16a.** Presencia de Cuerpos Elementales y reticulares de *Chlamydia trachomatis*. Comparación de las observaciones realizadas en el corte semifino teñido con azul de toluidina y con Isotiocianato de fluoresceína a 1000 aumentos. Superposición de imágenes. a. Corte semifino en capo claro y en escala de grises. b. Corte semifino IFD contrastado con azul de Evans. c. Superposición de imágenes.

Cuando se analizó la presencia de leucocitos de acuerdo a la prueba IFD en el semifino, 8 de los 16 casos con leucocitos pertenecieron al Grupo Positivo y 8 al Grupo Negativo, sin que se registrara diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,189$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

#### 5.3.1.1.1 Leucocitos con Inclusiones Bacterianas

En el 17,5% de los 80 pacientes estudiados se encontraron leucocitos con evidencia morfológica de inclusiones bacterianas en su citoplasma, mientras que en el grupo control no fueron observados leucocitos. La cantidad de leucocitos con inclusiones bacterianas fue escasa en el 5% de dichos pacientes, registrándose este rasgo principalmente en el grupo 4 (14,3% de los casos). Una concentración de leucocitos con inclusiones bacterianas, que se consideró moderada, se observó en 7 pacientes: 4 del grupo 3 (12,9% de los casos), 2 casos del grupo 1 (9,1% de los casos) y 1 del grupo 2 (7,7% de los casos). En el grupo 4 de IGU por gérmenes distintos a *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.*, ninguno de los casos presentó leucocitos con inclusiones bacterianas en el examen del corte semifino. (Tabla IXa). La comparación del porcentaje de casos del grupo control y del grupo pacientes, que presentaron leucocitos con inclusiones bacterianas, no fue estadísticamente significativa ( $p=0,772$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

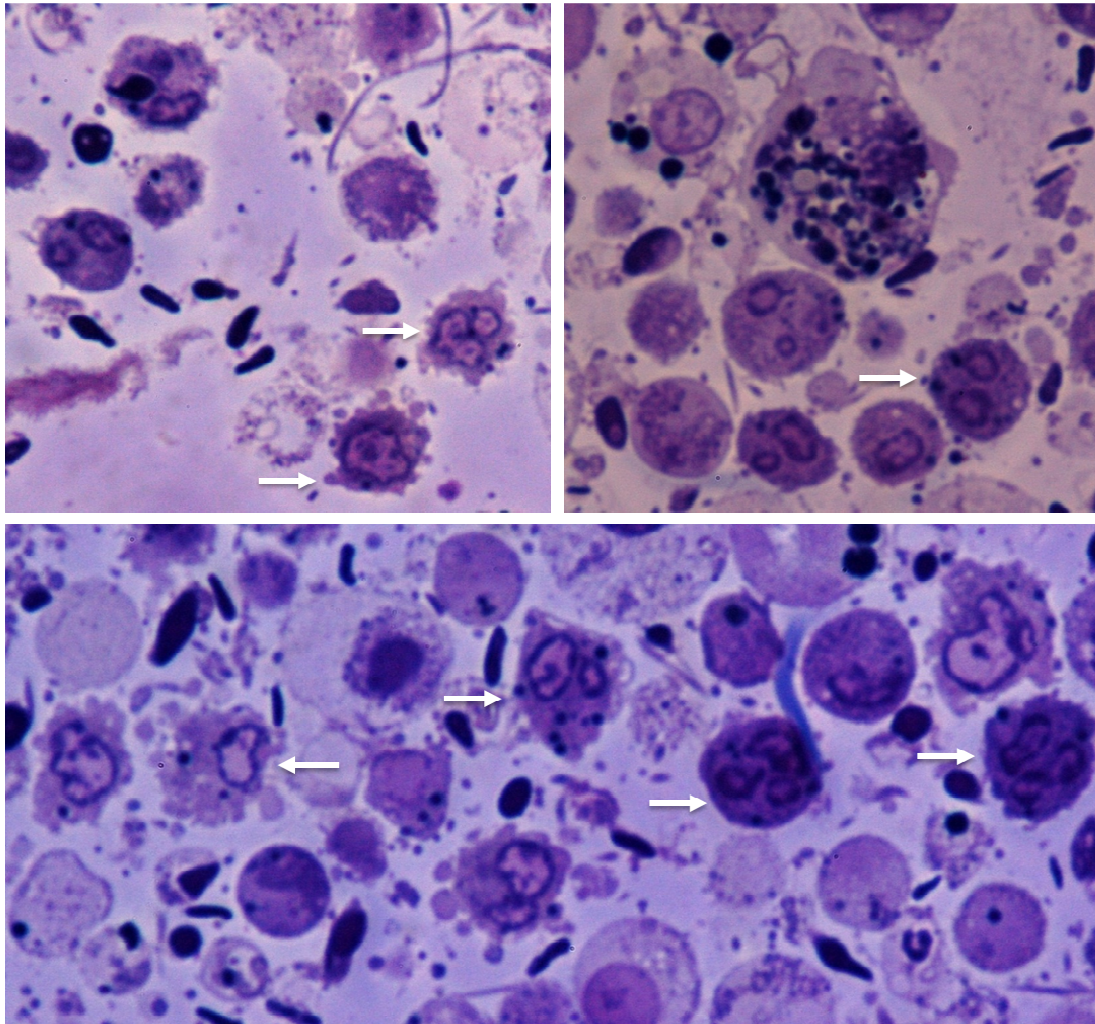
La presencia de leucocitos con inclusiones bacterianas en el semifino no fue diferente para los grupos IFD positivo y IFD negativo ( $p=0,45$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Tabla IXb).

#### 5.3.1.1.2 Leucocitos con Fagocitosis Inespecífica

Se observaron imágenes citológicas con evidencias de actividad fagocítica en el 13,2% de los pacientes (Fig. 2g) y no se presentó en el grupo control (diferencia estadísticamente no significativa con valor de  $p=0,772$ ;  $\chi^2$  de Pearson). La presencia de leucocitos con signos de actividad fagocítica fue considerada como escasa en el 7,5%, fue moderada en el 5%, abundante en el 2,5% y muy abundante en el 1,3% de los 80 pacientes estudiados. La presencia de este rasgo fue más marcada en el grupo 4, ya que se observó en el 27,6% de los casos. Aunque en un porcentaje menor, dicho rasgo también estuvo presente en: grupo 1 con 13,6%, en el grupo 3 con 13,1% y en el grupo 2 con 7,7%. (Tabla IXa).



### Leucocitos polimorfonucleares presentes en el líquido seminal.



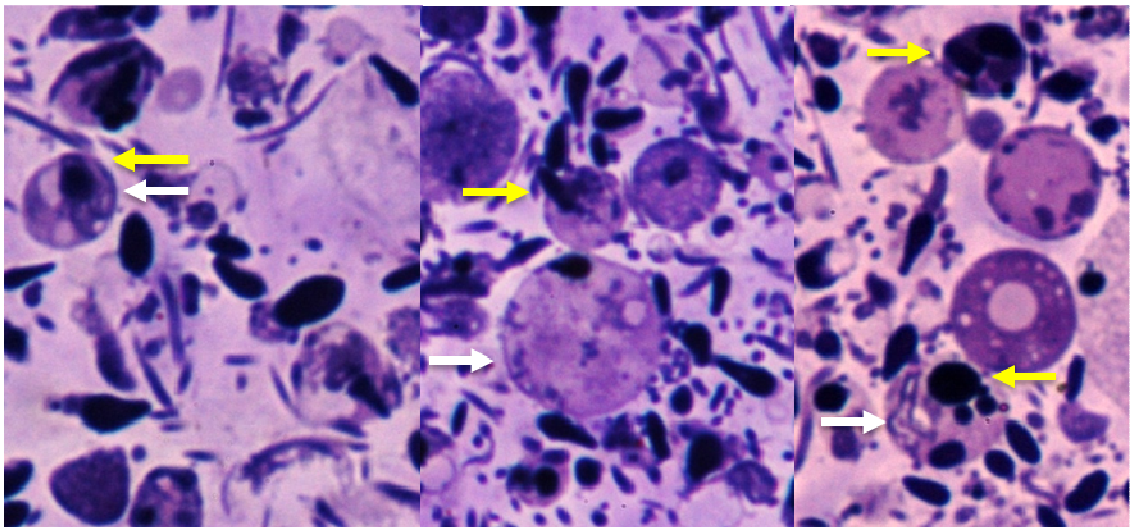
**Figura 16b.** Se observan múltiples leucocitos polimorfonucleares en las muestras de líquido seminal de los pacientes, estas células presentan bacterias adheridas a la membrana y en el citoplasma (flecha blanca). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

#### 5.3.1.1.3 Leucocitos con Fagocitosis de Espermatozoides

Se apreciaron imágenes demostrativas de incorporación de espermatozoides o de segmentos espermáticos en los leucocitos presentes en el líquido seminal de 9 pacientes (11,25%) [Figura 17], presentándose por igual en los grupos 1, 3 y 4 (dos casos en cada uno de estos grupos) y en un caso del grupo 2. En ninguno de los casos del grupo control se observaron imágenes de fagocitosis de espermatozoides por leucocitos (diferencia estadísticamente no significativa con valor de  $p=0,772$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Los datos correspondientes a éstas observaciones por grupo de pacientes se presentan en la Tabla IXa.



### Leucocitos con fagocitosis de espermatozoides

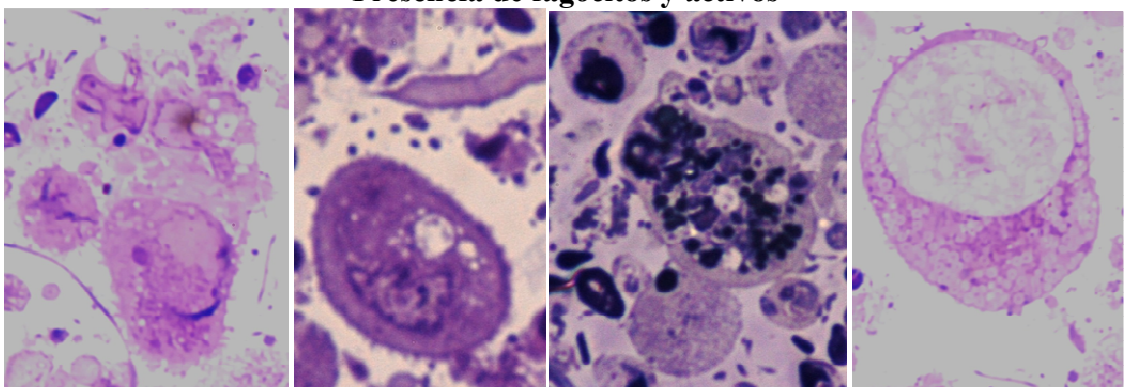


**Figura 17.** Se observan múltiples células fagocíticas cuya morfología nuclear corresponde a la de leucocitos polimorfonucleares y que presentan espermatozoides adosados a su superficie y bacterias incluidas en el citoplasma (flecha blanca). Se señala material nuclear compatible con el del espermatozoide en el citoplasma de leucocitos polimorfonucleares (flecha amarilla). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

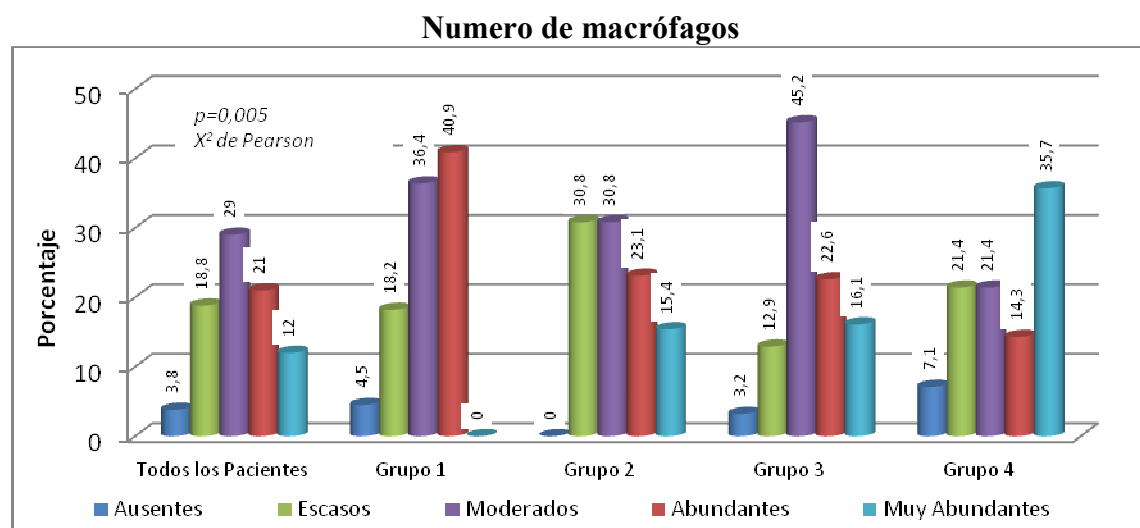
#### 5.3.1.2 Presencia de Fagocitos

La presencia de macrófagos (Figura 18) destacó en el grupo de pacientes, ya que se registró en 77 de los 80 pacientes evaluados (96,2%) y no se observó en los casos del grupo control, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el resto de los grupos ( $p=0,005$ ;  $\chi^2$  de Pearson) para ésta variable. La cantidad estimada de estas células fue escasa en 18,8%, moderada en 36,3%, abundante en 26,3% y muy abundante en 15% de los pacientes. Este rasgo fue sobresaliente en los grupos 2 (100% de los casos) y 3 (96,8% de los casos). Tabla IXa; Figura 19.

### Presencia de fagocitos y activos



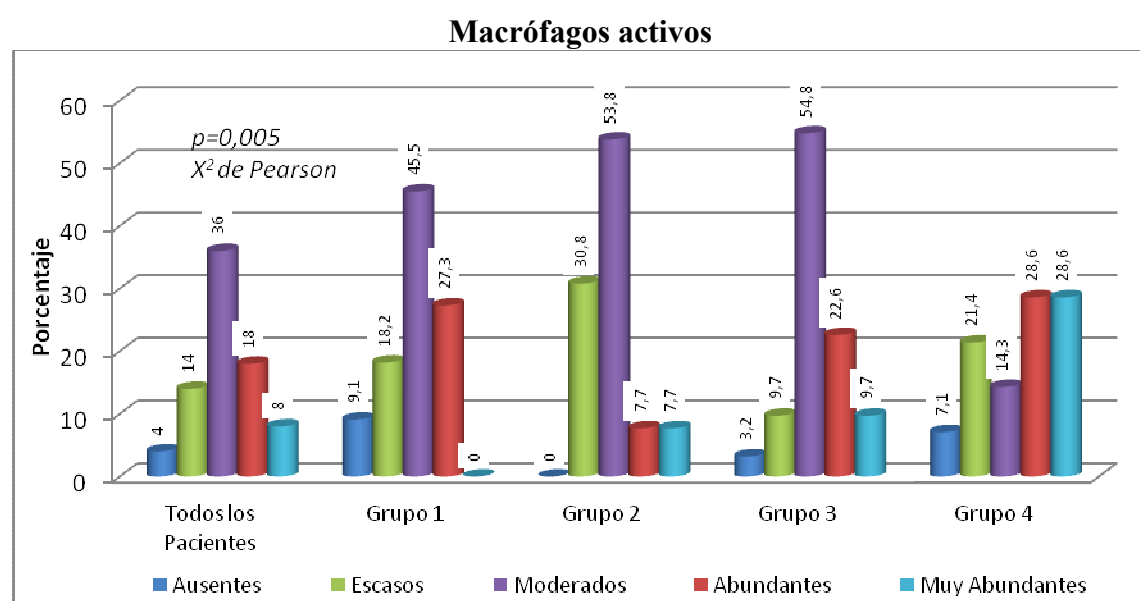
**Figura 18.** Células fagocíticas con citoplasma multiloculado, presentan bacterias adheridas a la membrana y libres en el plasma seminal. Se observan además espermatozoides y bacterias fagocitados. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.



**Figura 19.** Numero de macrófagos observados en los concentrados celulares de líquido seminal incluidos en resina de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

### 5.3.1.2.1 Fagocitos Activos

El 95% de los pacientes con infección presentaron macrófagos activos, en cantidad moderada a abundante, con vacuolas fagocíticas y la presencia de pseudópodos que se consideraron como signos de actividad fagocítica, existiendo una diferencia significativa cuando se analizó este rasgo citológico ( $p=0,005$ ;  $\chi^2$  de Pearson) entre el grupo control y el resto de los grupos de pacientes (Tabla IXa; Figura 20).

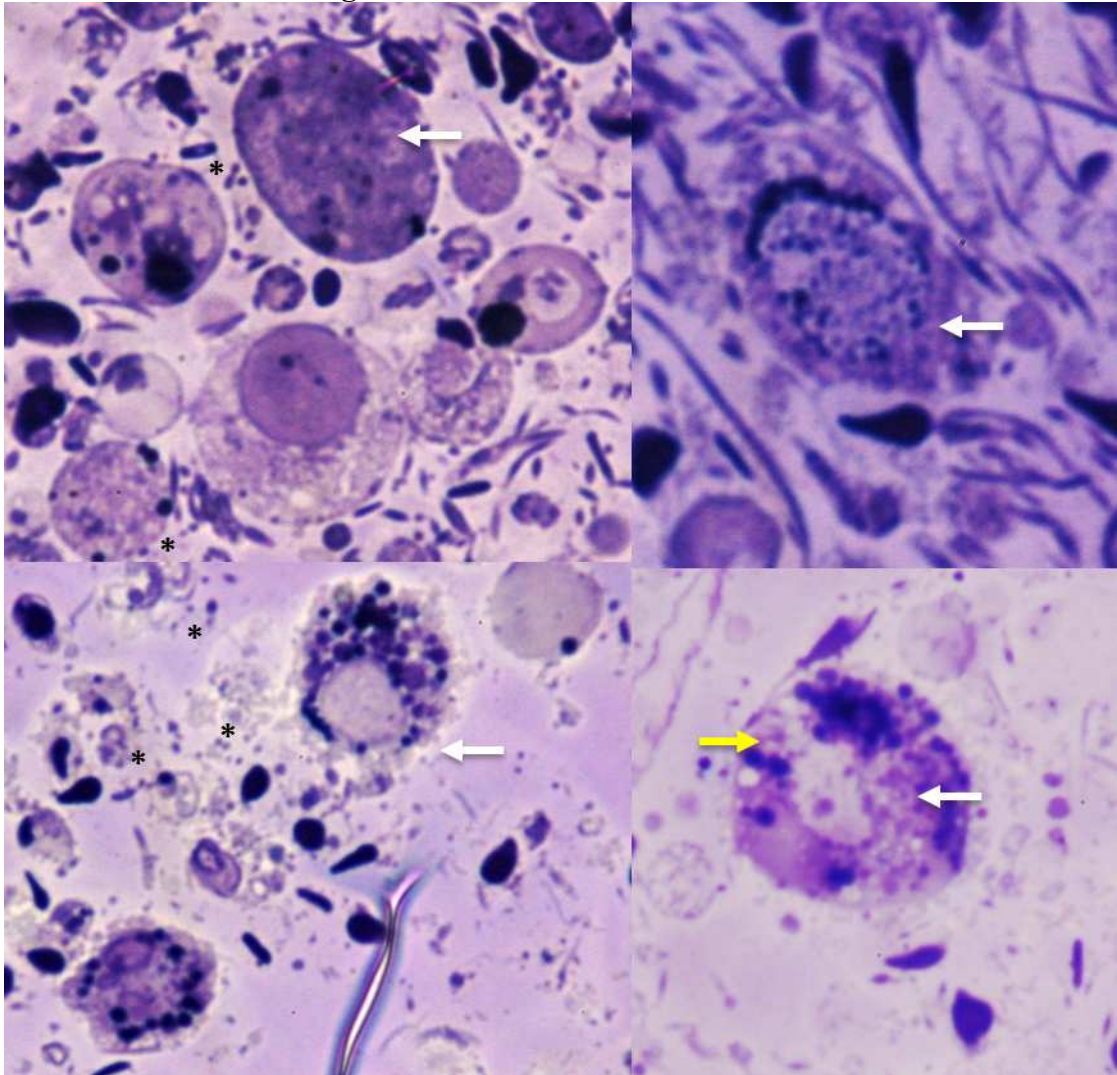


**Figura 20.** Presencia de macrófagos activos observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

### 5.3.1.2.2 Fagocitos con Inclusiones Bacterianas

En el 92,5% de los pacientes, los macrófagos observados presentaban inclusiones bacterianas en su citoplasma (Figura 21) que se calificaron como muy abundantes, abundantes o moderadas, en el 100% de los casos del grupo 2, en el 96,8% de los del grupo 3, en el 86,5% de los casos del grupo 1 y en el 85,7% del grupo 4.

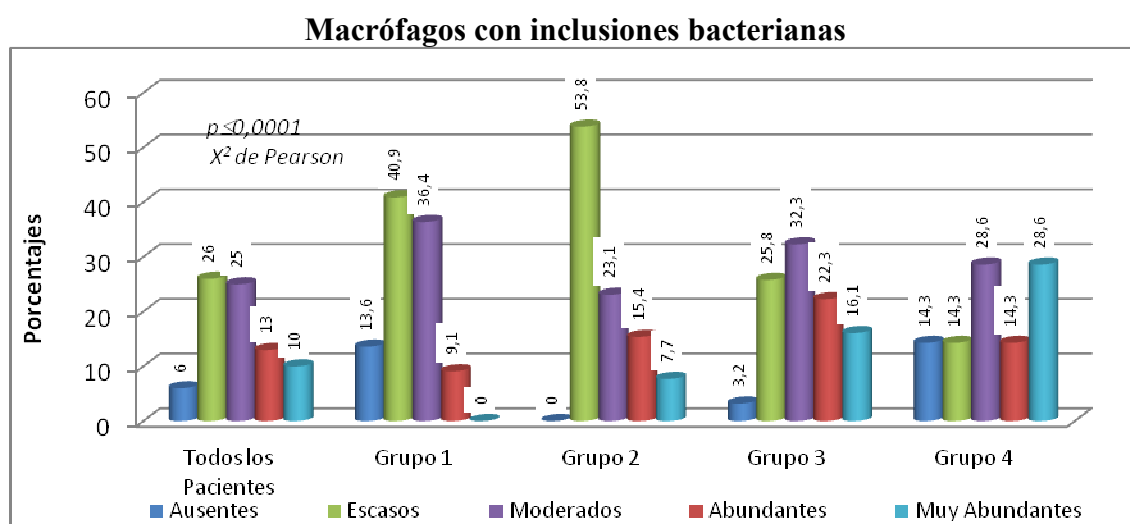
**Fagocitos con inclusiones bacterianas**



**Figura 21.** El contenido fagocitado es de aspecto finamente granular y en el citoplasma se aprecian áreas tenuemente multiloculadas sugestivas de cuerpos reticulares (flecha blanca). Se observan además bacterias libres en el espacio extracelular (\*). La flecha amarilla señala una célula fagocítica con un espermatozoide adherido a su superficie (flecha amarilla). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

De igual manera, encontramos diferencias entre el grupo control y el resto de los grupos ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson) para la variable macrófagos con inclusiones bacterianas (Tabla IXa; Figura 22).

Mientras que en el grupo IFD positivo en el semifino incluyó 44 de los 74 casos en los que se observaron fagocitos con inclusiones bacterianas, pertenecieron al grupo IFD positivo. El resto quedó comprendido en el grupo IFD negativo ( $p=0,482$ ; Fisher). (Tabla IXb).

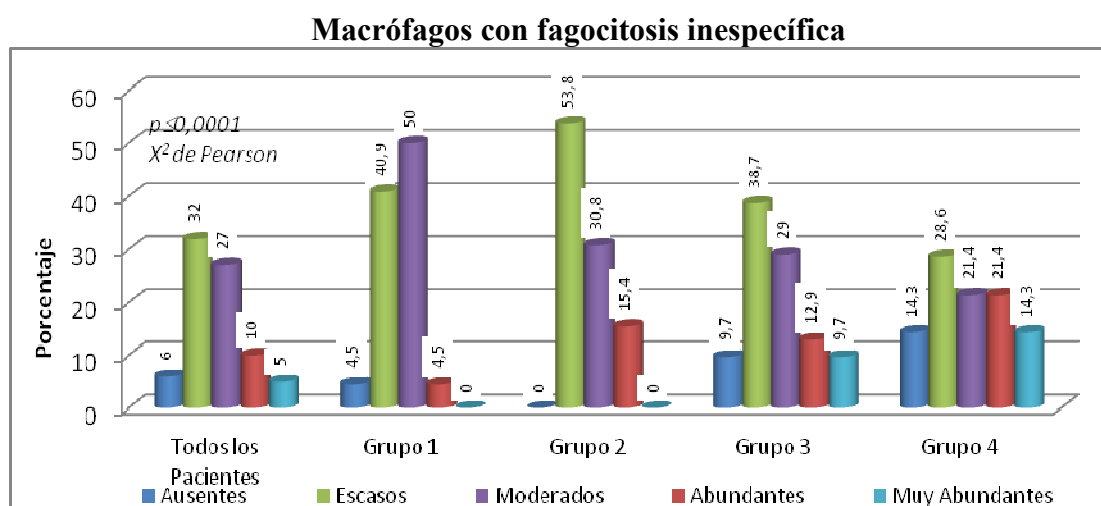


**Figura 22.** Presencia de macrófagos con inclusiones bacterianas observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

### 5.3.1.2.3 Macrófagos con Fagocitosis Inespecífica

En 74 pacientes (92,5%) se observaron macrófagos con signos de fagocitosis inespecífica. Estos macrófagos activos se presentaron en cantidad escasa en 40%, en cantidad moderada en 33,8%, en cantidad abundante en 12,5% y muy abundante en 6,5%. Todos los pacientes del grupo 2, (IGU por sólo Clamidia) y 21 de los 22 casos del grupo con *Mycoplasma spp.* y *Chlamydia trachomatis*, presentaron este hallazgo citológico, aunque predominantemente en el grado escaso a moderado. Los grupos en donde la presencia de macrófagos con evidencias de fagocitosis inespecífica fue más acentuada correspondieron al grupo 2 y 3 (Tabla IXa; Figura 23). En relación al número de macrófagos con fagocitosis inespecífica, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo de pacientes ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson).



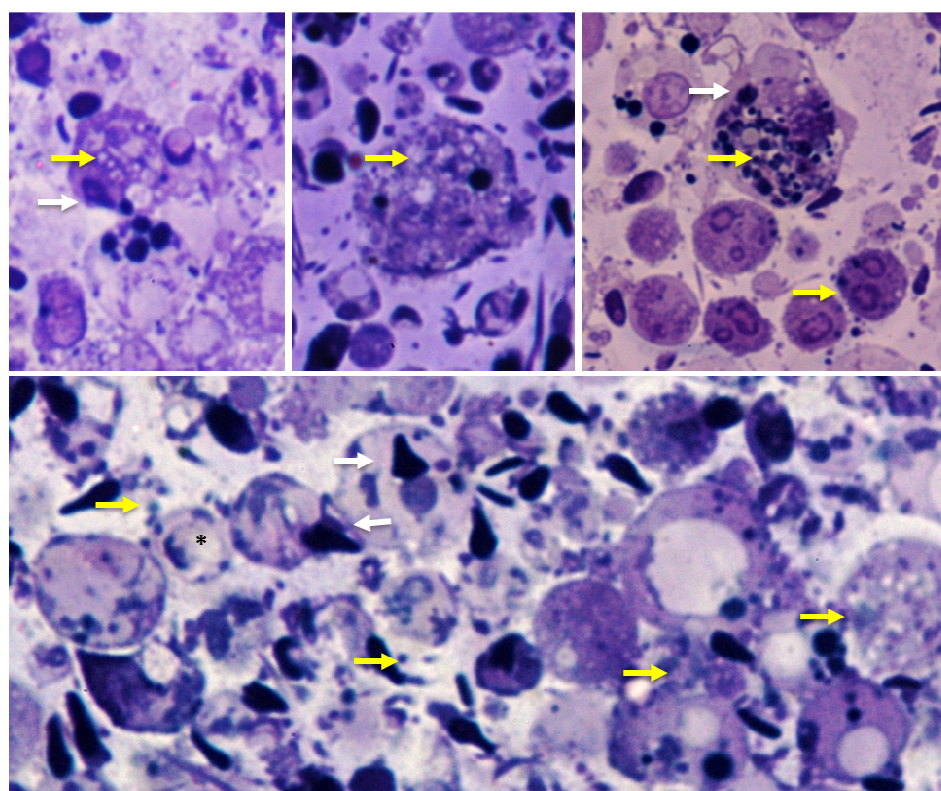


**Figura 23.** Presencia de macrófagos con fagocitosis inespecífica observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

#### 5.3.1.2.4 Macrófagos con Fagocitosis de Espermatozoides

En el 85% de los casos en los que se observaron fagocitos, se apreció englobamiento de espermatozoides o de segmentos espermáticos en su citoplasma (Figura 24a).

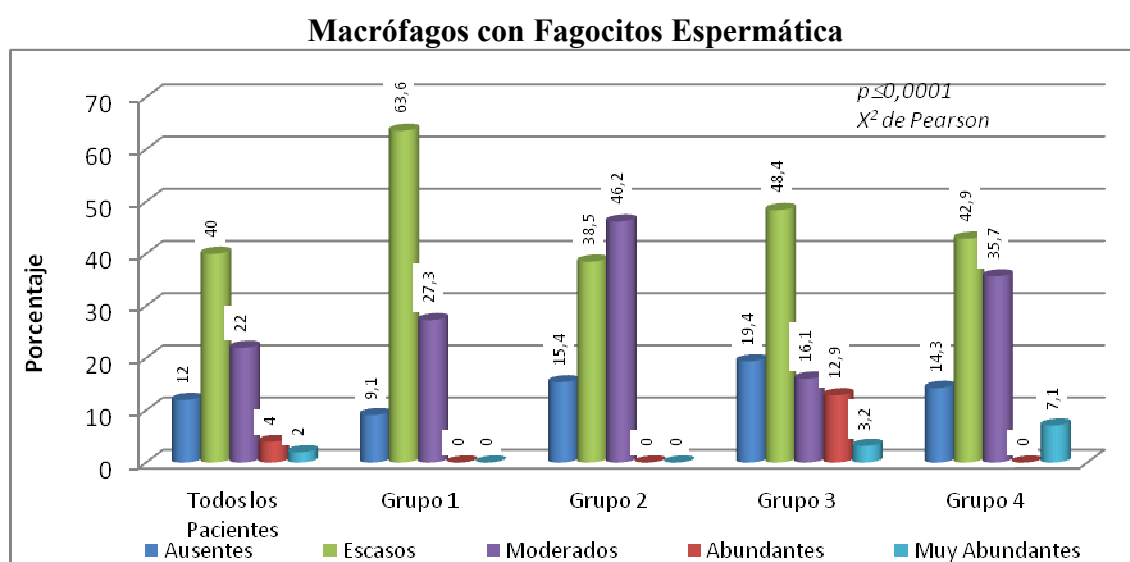
#### Fagocitosis de espermatozoides



**Figura 24a.** Se aprecian múltiples células fagocíticas conteniendo material nuclear de electrodensidad compatible con la de los espermatozoides, de localización intracitoplasmática y adosados a la membrana de los macrófagos (Flecha Blanca). Se aprecian además vesículas de contenido finamente granular en el interior de los macrófagos, bacterias adheridas a su superficie y libres en el espacio extracelular (Flecha amarilla) Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

Este rasgo se consideró presente en cantidad escasa o leve en 50%, moderada en 27,5%, marcada en 5% y muy marcada en 2,5% de los pacientes. Aunque la fagocitosis de espermatozoides por macrófagos se registró en todos los grupos de pacientes, fue más frecuente (90,9%) en el grupo 1 de IGU por *Mycoplasma* y *Clamidia*. Igualmente, este rasgo fue muy frecuente en el grupo 4 (12 de los 14 casos: 85,7%), en el grupo 2 de IGU sólo por *Clamidia* (84,6%) y en el grupo 3 de IGU solo por *Mycoplasma spp.* (80,6%).

Con respecto al número de macrófagos con fagocitosis de espermatozoides, el grupo control se diferenció del resto ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Tabla IXa; Figura 24b.



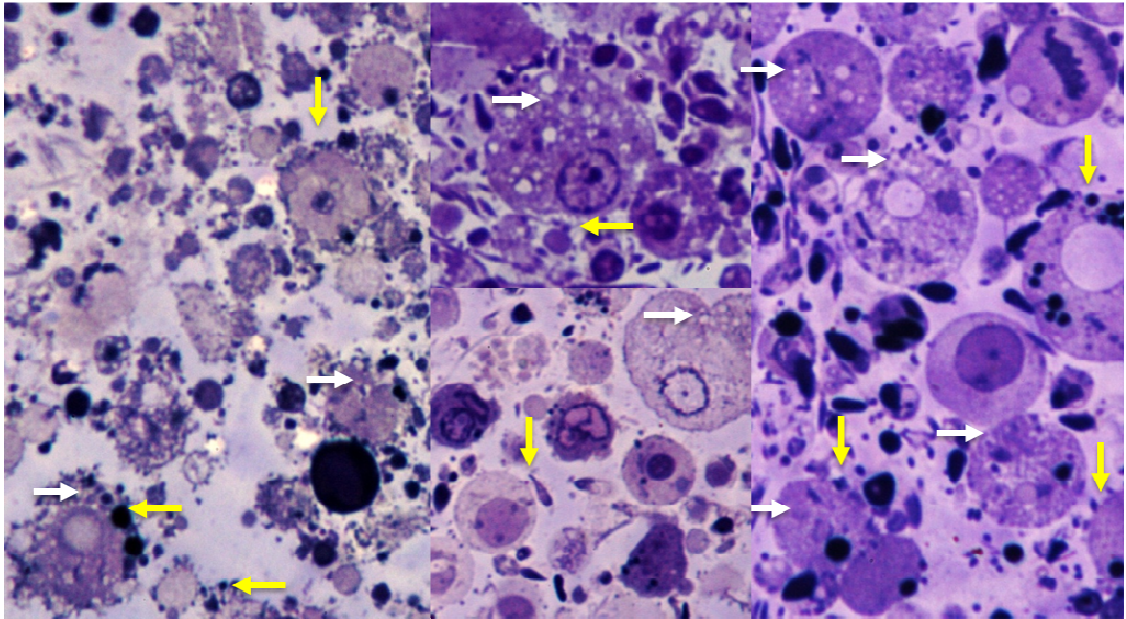
**Figura 24b.** Presencia de macrófagos con fagocitosis espermática observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

#### 5.3.1.2.5 Macrófagos con Bacterias Adheridas

Se observaron macrófagos con bacterias en el 96,2% de los pacientes, siendo de un grado leve o escaso en el 33,8% de ellos, moderado en un porcentaje igual (33,8%), marcado o abundante en el 21,3% y severo o muy abundante en el 7,5%. Aunque en el grupo 2, todos los pacientes presentaron bacterias adheridas a los macrófagos, el rasgo fue calificado como leve en la mayoría de los casos (61,5%) (Figura 25a). En cambio, moderado a severo o muy frecuente, en el 38,7% del grupo 3, y en el 28,6% del grupo 4 (Tabla IXa; Figura 25b). La presencia de macrófagos con bacterias adheridas fue significativamente mayor respecto al grupo control en todos los grupos analizados ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

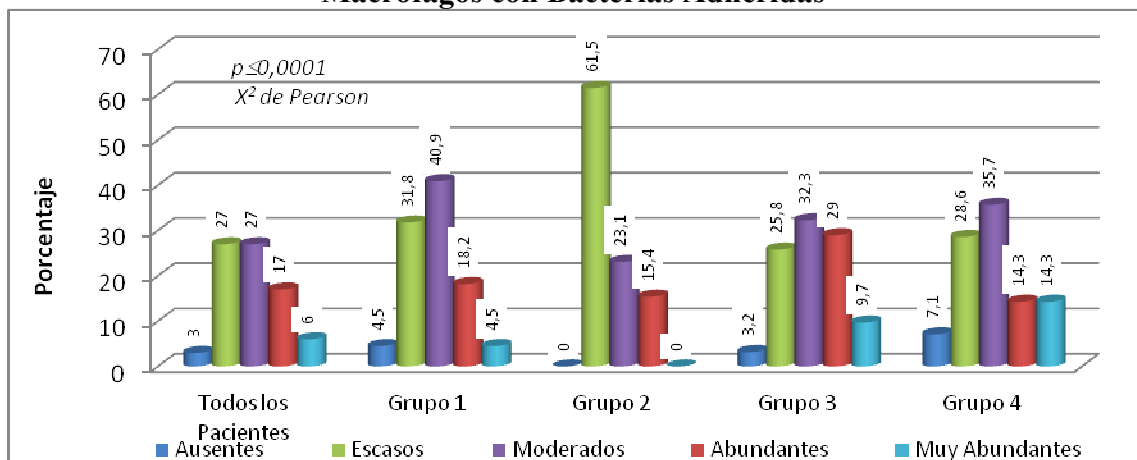
De acuerdo a nuestras observaciones, 46 de los 77 casos en los que se observaron fagocitos con partículas bacterianas adheridas a su superficie, pertenecieron al grupo IFD Positivo, los 31 restantes quedaron comprendidos en el grupo IFD negativo sin que la diferencia entre estas cifras fuera estadísticamente significativa ( $p=0,368$ ; Fisher). Tabla IXb).

### Macrófagos con bacterias adheridas



**Figura 25a.** Macrófagos con bacterias adheridas. En ésta imagen destaca la presencia de células fagocíticas de citoplasma vacuolado, algunas de las cuales contienen partículas bacterianas (Flecha Blanca). Adheridos a la membrana plasmática y rodeada por pseudópodos, se observan bacterias y espermatozoides (Flecha amarilla). También se observan restos citoplásmicos con bacterias incluidas y detritus celulares (\*). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

### Macrófagos con Bacterias Adheridas



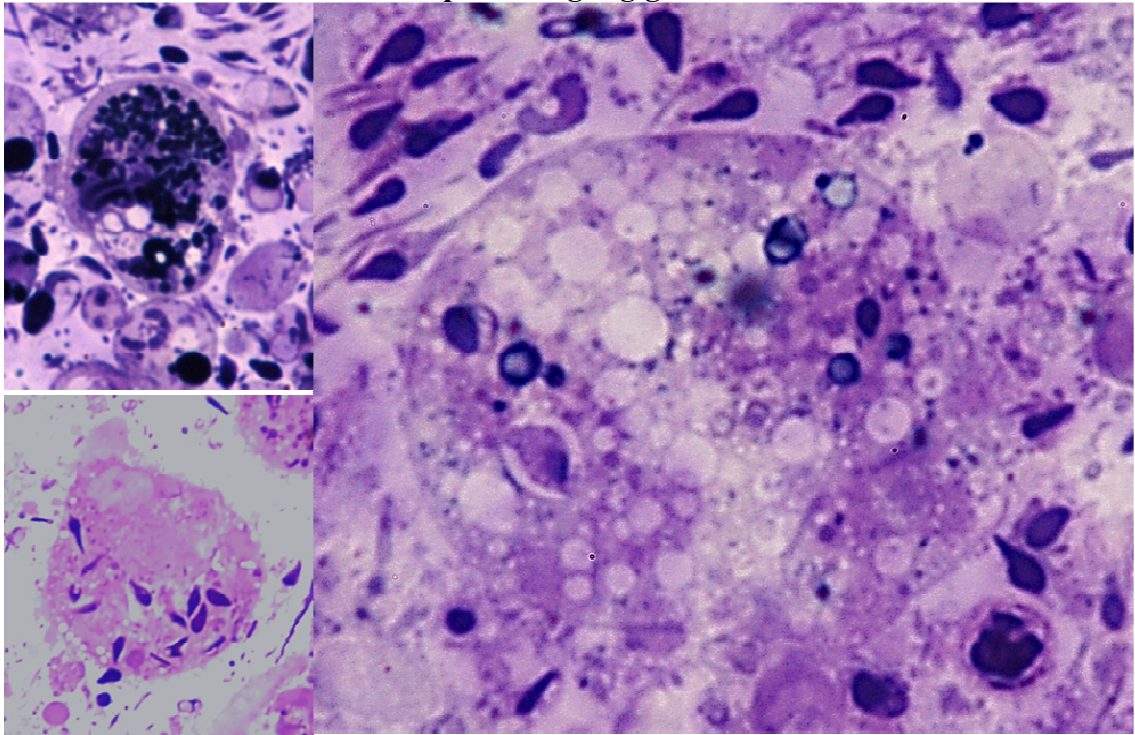
**Figura 25b.** Presencia de macrófagos con bacterias adheridas observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio



### 5.3.1.2.6 Espermiófagos Gigantes

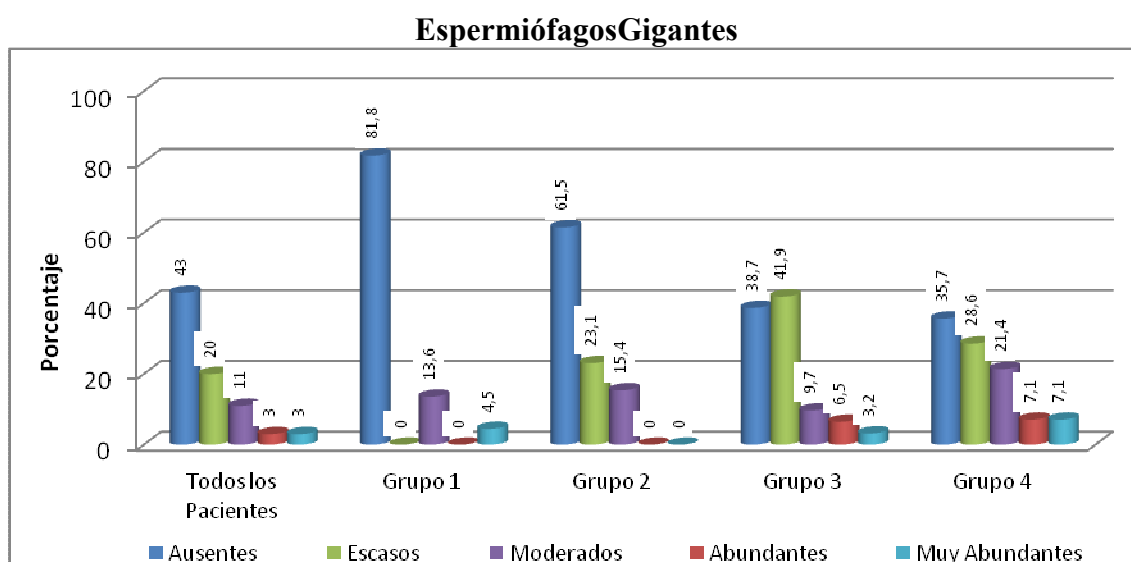
La presencia de células fagocíticas gigantes, de 120 a 150 micras de diámetro, de citoplasma vacuolado, y con múltiples segmentos espermáticos incluidos en el citoplasma, (Figura 26) se observó en 37 de los pacientes evaluados. En la mayoría de los casos (25%), se presentaron en cantidad escasa, en 13,8% su presencia fue moderada, en 3,8% fue abundante y en igual proporción fue muy abundante. Se encontraron espermiófagos gigantes con mayor frecuencia y en mayor cantidad en el grupo 4, (74,3% de los casos) y en 61,3% de los casos del grupo 3 (Tabla IXa y Figura 27). Analizada la presencia de espermiófagos gigantes, no se observaron diferencias significativas respecto al grupo control y el grupo de pacientes ( $p \leq 0,097$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

#### Espermiófagos gigantes



**Figura 26.** Espermiófagos gigantes. Imágenes en la que se observan células fagocíticas de citoplasma multivacuolado con bacterias incluidas, espermatozoides y bacterias adheridas a la membrana plasmática. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

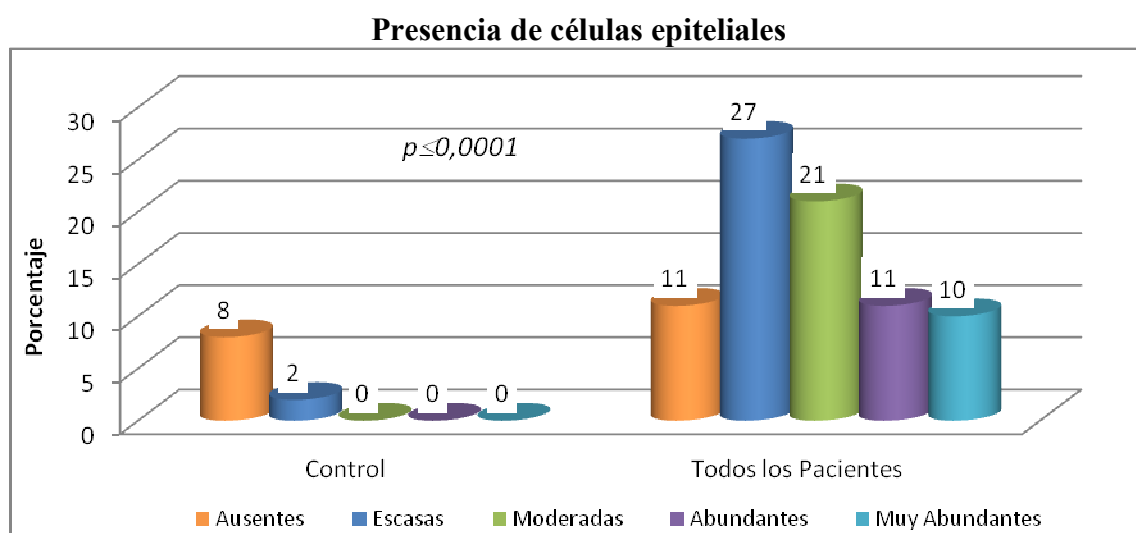




**Figura 27.** Presencia de espermiófagos gigantes observados en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

### 5.3.1.3 Presencia de Células Epiteliales

Las células epiteliales en el líquido seminal adquieren morfologías muy variadas, aunque predominan las células de aspecto pavimentoso con amplio citoplasma; sin embargo, en los líquidos seminales infectados, las células epiteliales presentan frecuentemente cambios degenerativos consistentes en fenómenos de cariorrexis o cariolisis, y un citoplasma denso y plegado, y en ocasiones, vacuolado. La presencia de células epiteliales fue observada en 82,5% de los pacientes y en 20% de los casos del grupo control. La cantidad de células epiteliales fue escasa en 33,8% de los pacientes, moderada en 26,3%, abundante en 13,8% y muy abundante en 12,5%. La presencia de células epiteliales fue muy frecuente y marcada tanto en el grupo 4, *Chlamydia* y *Mycoplasma* negativos (92,8%) como en el grupo 1 *Chlamydia* y *Mycoplasma* positivos (90,9%), en el que además se encontraron la mayor parte de los casos con exfoliación epitelial marcada: 18,2% de los casos con muy abundantes células epiteliales. La comparación de la presencia de células epiteliales en el grupo de pacientes contra la del grupo control, fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson). La presencia de éste rasgo citológico en los grupos de pacientes de acuerdo a diagnóstico microbiológico se aprecia en la tabla IXa y se ilustra en las Figura 28 y 29.



**Figura 28.** Presencia de células epiteliales observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

### 5.3.1.3.1 Células Epiteliales Con Inclusiones Bacterianas

En el 82,5% de los casos en los que se observaron células epiteliales, se pudo apreciar la presencia de inclusiones en el citoplasma (Figura 29), predominantemente en cantidad escasa a moderada (62,5%). En un porcentaje menor, la presencia de inclusiones fue abundante (13,8%) o muy abundante (6,3%). Las células epiteliales con inclusiones se vieron en mayor cantidad y con mayor frecuencia en el grupo 4 (92,9%), predominantemente en cantidad escasa (57,1% de los casos). En el resto de los grupos, el número de casos que presentaron células epiteliales fue cercano al 80%, y siguieron reportándose en la mayor parte de ellos en cantidad escasa, como puede corroborarse en la Tabla IXa. La comparación de la presencia de células epiteliales en el grupo de pacientes contra la del grupo control, fue estadísticamente significativa ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

En el análisis por grupos de acuerdo al diagnóstico por IFD, 60,6% de los casos con células epiteliales con inclusiones bacterianas correspondieron al diagnóstico IFD positivo, mientras que 39,4% fueron IFD negativo, sin que ésta diferencia porcentual fuera significativa ( $p=0,330$ ; Fisher). Tabla IXb.

### 5.3.1.3.2 Células Epiteliales Con Bacterias Adheridas

Con frecuencia se observaron células epiteliales con bacterias adheridas a su superficie en todos los grupos de pacientes con infección (78,7%), en cambio no se vieron en los voluntarios del grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa

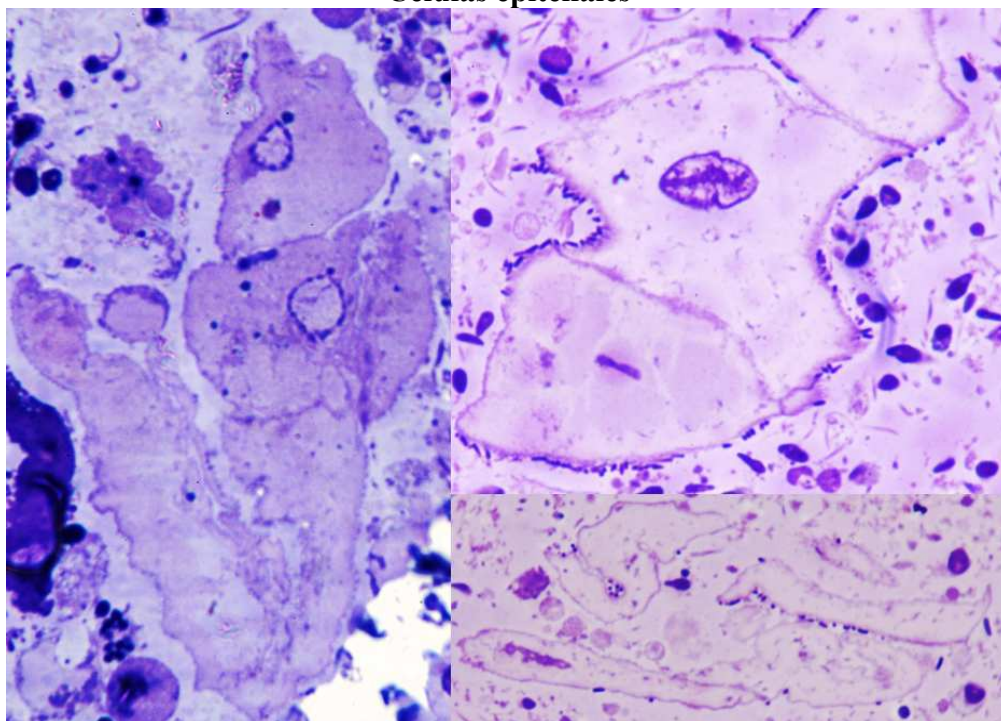
( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson) (Figura 29). En la mayor parte, esta observación se dio en cantidad escasa o moderada (32,3% de los pacientes), y en un porcentaje bajo (7,7%) se calificó de abundante a muy abundante (15%). El grupo en el que más se destacó esta observación fue el grupo 4 de IGU por otros gérmenes distintos de *Chlamidia* o *Mycoplasma*, donde el 88,6% de los pacientes presentaron células epiteliales con bacterias adheridas a su superficie, 50% de ellos en cantidad moderada o muy abundante.

De los 63 casos en los que se observó la presencia de células epiteliales con bacterias adheridas, el 61,9% fueron diagnosticados como IFD positivos siendo ésta característica no significativa al comparar éste porcentaje con el que correspondió al grupo IFD negativo ( $p = 0,204$ ; Fisher). Tabla IXb.

### 5.3.1.3.3 Células Epiteliales en Autólisis

En la mayoría de los casos del grupo de pacientes (76,2%) se observaron células epiteliales de aspecto basófilo y tamaño disminuido (Figura 29), que se presentaron generalmente en cantidad escasa (38,8%) y en menor porcentaje en cantidades moderada (25%), abundante (11,3%) o muy abundante (1,3%).

**Células epiteliales**



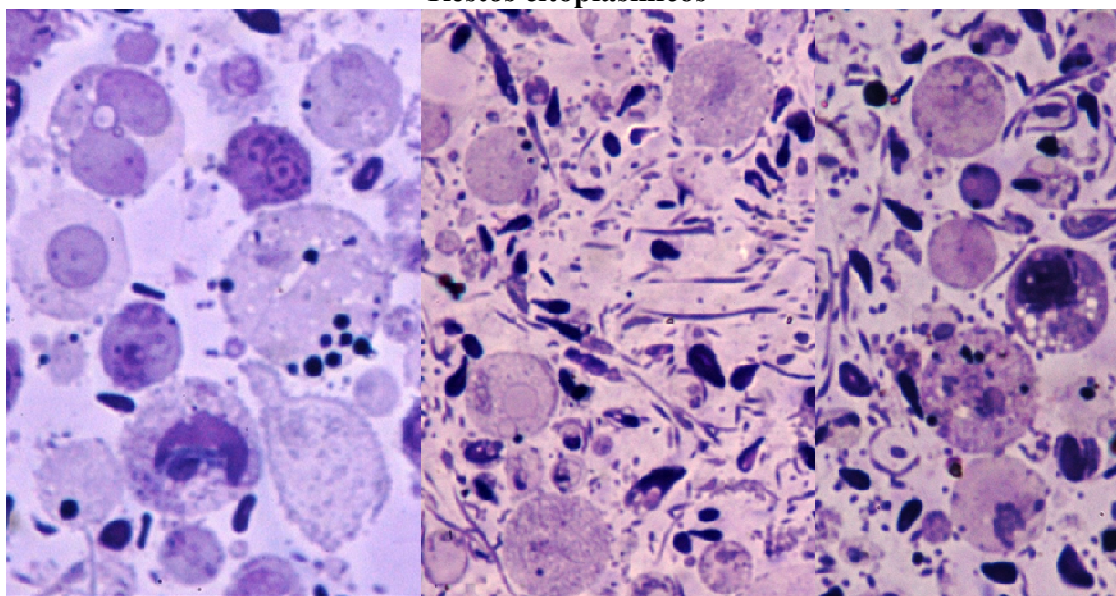
**Figura 29.** Células epiteliales presentes en el líquido seminal de pacientes infértiles. El citoplasma es de aspecto granular con bacterias adheridas a la membrana plasmática y localizadas en el espacio extracelular y bacterias de morfología compatible con cuerpos elementales de *Chlamydia*, una de ellas presenta en una zona cercana al núcleo una estructura compatible con un cuerpo reticular. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro

El mayor porcentaje de casos en los que se encontraron células epiteliales autolisadas correspondieron al grupo 1 (81,8%) con diagnóstico de IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.* En ninguno de los casos del grupo control se observaron células epiteliales con signos de autólisis, de forma significativa los grupos con IGU del grupo control ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

#### 5.3.1.4 Presencia de Restos Citoplásmicos

En 30% de los casos del grupo control y en 95% de los pacientes, ( $p \leq 0,0005$ ;  $\chi^2$  de Pearson), se encontraron en el examen del corte semifino del “pellet” seminal, restos citoplásmicos de células redondas, cuya estirpe celular no pudo ser establecida por presentar diversos grados de cambios autolíticos: citoplasma hialino y grumoso, con límite poco definido y, en la mayoría de las células, sin núcleo visible (Figura 30).

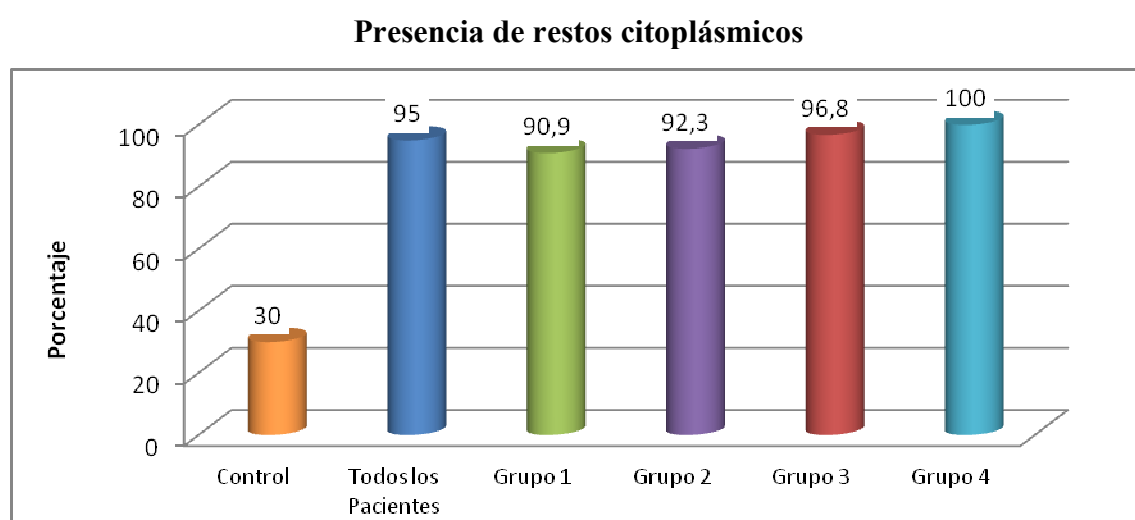
**Restos citoplásmicos**



**Figura 30.** Se observan múltiples restos citoplásmicos de aspecto finamente multiloculado con partículas bacterianas adheridos y en el interior de los restos citoplásmicos, morfológicamente compatibles con cuerpos elementales de *Chlamydia* (flecha gruesa), y *Mycoplasma* (flecha delgada). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro

Estos restos celulares fueron escasos en el 22,5% de los pacientes y en todos los casos del grupo control que fueron observados: moderados (25%), abundantes (17,5%) y muy abundantes, (30%) en los pacientes. En el grupo 2, (IGU por *Chlamydia trachomatis*), 12 de los 13 pacientes presentaron restos citoplásmicos en cantidad escasa y moderada, a

abundante en el mismo porcentaje de casos: 46,2%. Las cifras totales de restos celulares para cada grupo se presentan en la (Tabla IXa, Figura 31).



**Figura 31.** Presencia de restos citoplásmicos observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

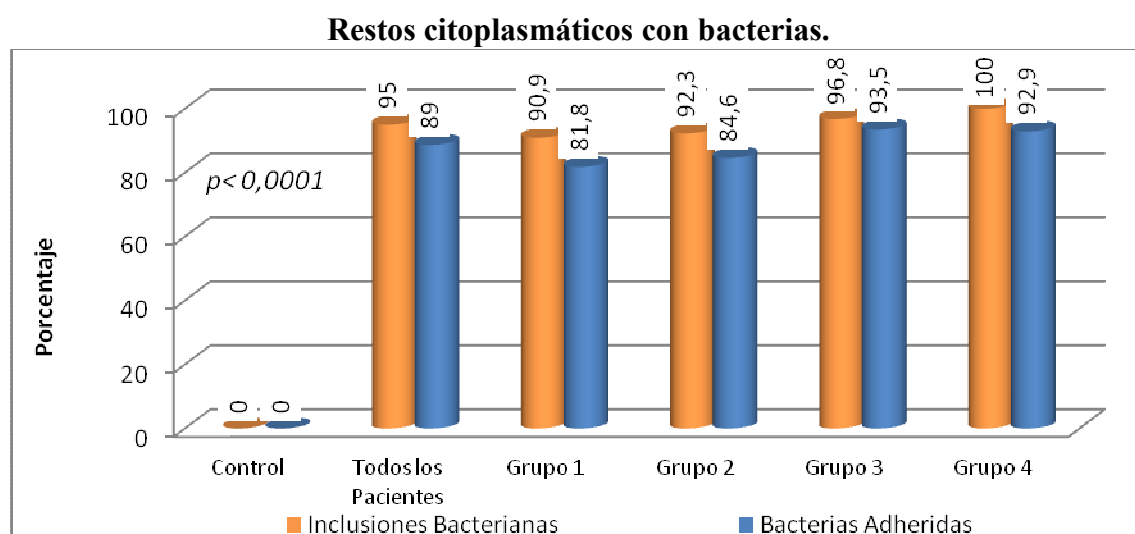
Todos los casos del grupo 4 presentaron restos citoplásmicos: en cantidad escasa; 35,7%; moderada: 28,6%; abundante: 28,6% y muy abundante: 7,1%. La observación de ésta alteración citomorfológica destacó también en el grupo con IGU por *Mycoplasma spp.*, donde, además de encontrarse en un porcentaje elevado de casos (96,8 %), en la mayoría, la cantidad de restos citoplásmicos fue moderada: 51,6%.

#### 5.3.1.4.1 Restos Citoplásmicos Con Bacterias

Con mucha frecuencia se observaron bacterias asociadas a los restos citoplásmicos (Figura 30), tanto en el interior (95% de los casos), como adheridos a su superficie (88,7% de los casos). El 72,6% de los pacientes presentaron escasa o moderada cantidad de restos citoplásmicos con bacterias en su interior y el 70% las presentaban adheridas a la superficie. En un porcentaje menor de los casos de pacientes, la cantidad de restos citoplásmicos con bacterias adheridas (el 22,2%), e incluidas (el 18,8%), fue calificada como abundante y muy abundante.

Al analizar comparativamente la presencia de restos citoplásmicos con bacterias incluidas en el citoplasma y el número de restos citoplasmáticos con bacterias adheridas, se observó un aumento significativo en el grupo de grupo de pacientes respecto al grupo

control, que fue estadísticamente significativo para los dos parámetros:  $p \leq 0,0001$  ( $\chi^2$  de Pearson) y  $p \leq 0,0001$  ( $\chi^2$  de Pearson) respectivamente. Tabla IXa, Figura 32.



**Figura 32.** Presencia de restos citoplasmáticos con bacterias incluidas y adheridas observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

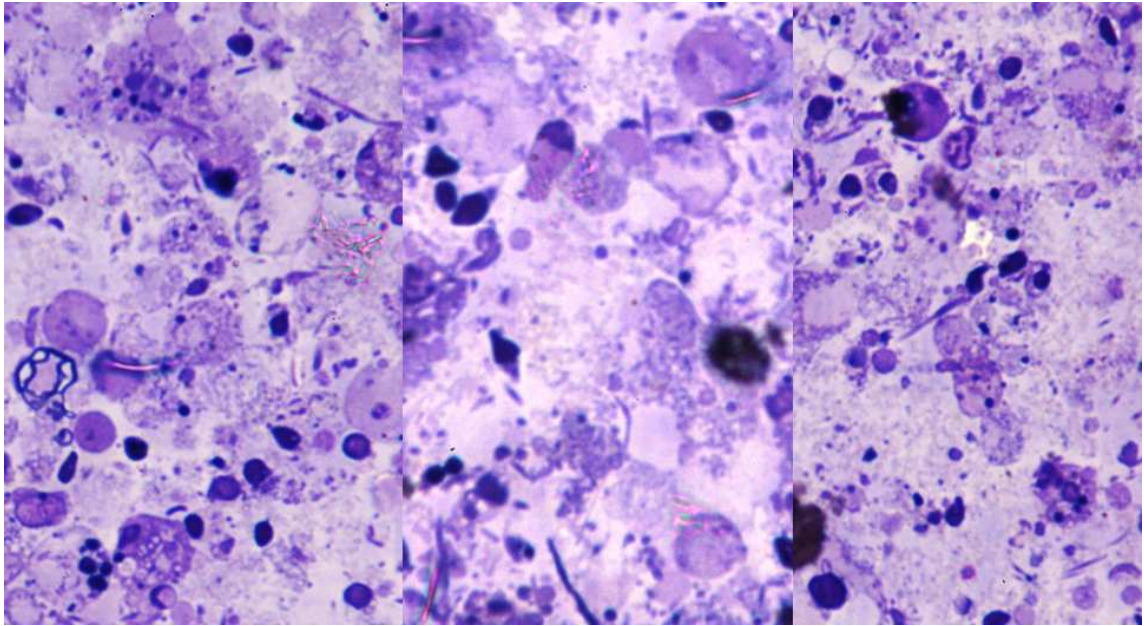
La comparación de la presencia de células epiteliales con bacterias incluidas, entre el grupo IFD positivo (57,9% de los casos) e IFD negativo (42,1% de los casos), resultó estadísticamente no significativa ( $p=0,451$ ; Fisher). De igual forma, la observación de células epiteliales con bacterias adheridas, resultó ser no significativa en la comparación de los casos IFD positivo e IFD negativo ( $p=0,204$ ; Fisher).

### 5.3.1.5 Presencia de *Detritus* Celulares

La presencia de fragmentos muy pequeños de células autolisadas, (Figura 33) fue apreciada consistentemente en todos los casos del grupo de pacientes, mientras que fue vista en cantidad escasa (30%) en un grupo menor de los casos del grupo control, evidenciándose un incremento significativo desde el punto de vista estadístico ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson) en el grupo con IGU, respecto al control.

En 12,5% de los pacientes con IGU, la cantidad de restos citoplasmáticos o *detritus* celulares fue escasa, pero el 87,5% de los casos contenía en una cantidad moderada a muy abundante, incluyendo el 68,2% de los casos del grupo 1, 62,1% del grupo 2, 51,6% del grupo 3 y 50% del grupo 4. Tabla IXa.



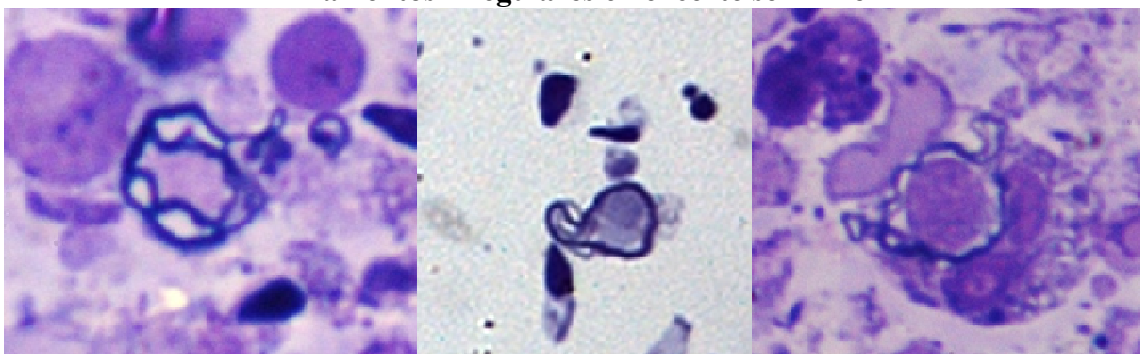
**Detritus celulares**

**Figura 33.** La imagen muestra una extensa área de detritus celulares en la que se encuentran inmersos espermatozoides y bacterias. También se observan restos citoplásmicos de aspecto multilocular. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

### 5.3.1.6 Presencia de Filamentos Irregulares

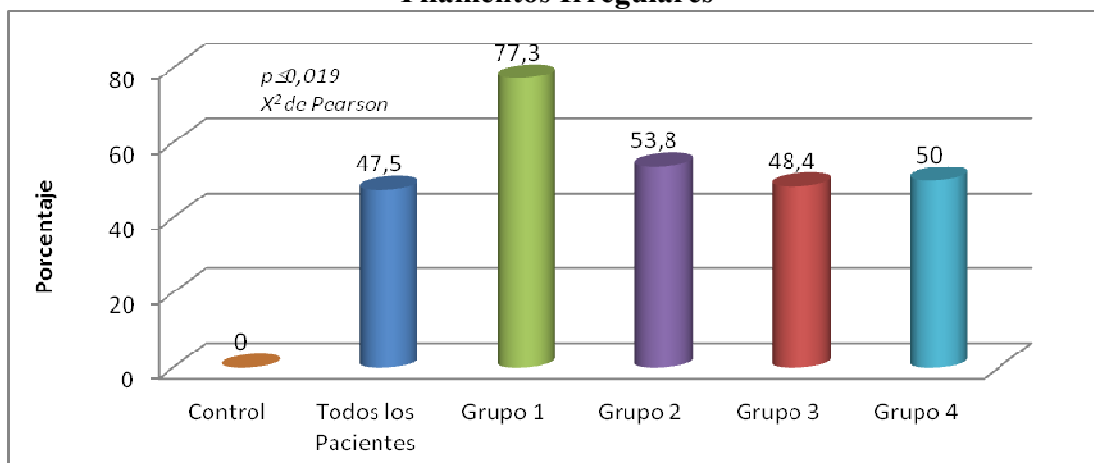
Con una frecuencia del 47,5% de los pacientes, se registró la presencia de agregados de estructuras fibrilares basófilas de trayecto irregular y grosor de 0,2 micras, que se encontraron libres en el espacio extracelular y en ocasiones cercanas a las áreas de *detritus* (Figura 34). Generalmente se observaron en escasa cantidad: 45% de los casos de pacientes, y con menor frecuencia en cantidad moderada (6,3% de los casos), abundantes (3,8% de los casos de pacientes) y muy abundantes (2,5% de los casos de pacientes). Al observar el comportamiento de este hallazgo por grupos, se encontró que esta observación fue más frecuente en los casos del grupo Clamidia y Mycoplasma con el 77,3% de los casos (Tabla IXa; Figura 35). No se observaron filamentos irregulares en ningún caso del grupo control, siendo su presencia inferior frente a todos los grupos de pacientes ( $p \leq 0,019$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

### Filamentos irregulares en el corte semifino



**Figura 34.** Filamentos irregulares en el corte semifino. Se observan cuerpos fibrilares intensamente basófilos asociados a restos citoplásmicos y a detritus celulares. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

### Filamentos Irregulares



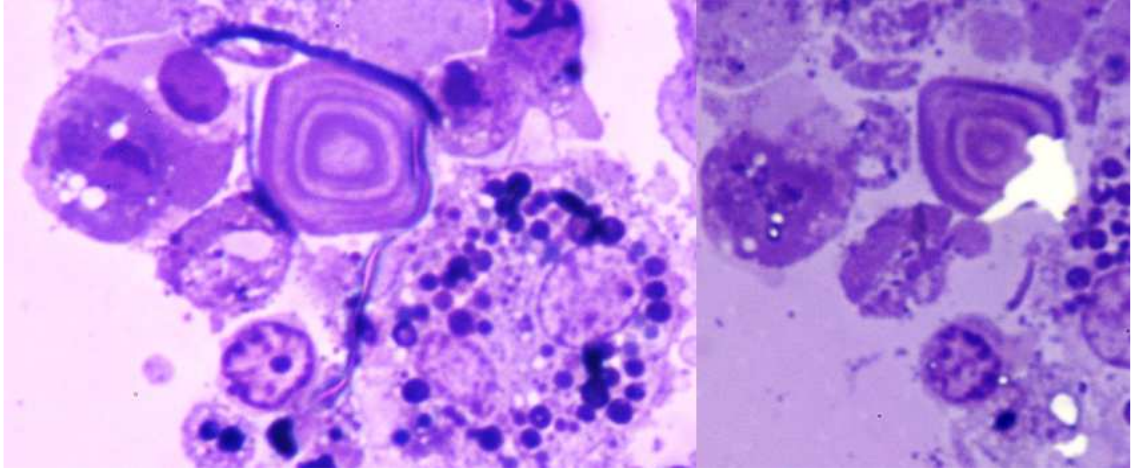
**Figura 35.** Presencia de filamentos irregulares observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

#### 5.3.1.7 Presencia de Cuerpos Amiláceos de la Próstata

Estructuras esféricas u ovoides, hialinas, acidófilas, de estructura laminar concéntrica, (Figura 36) fueron observadas en el semen del 34,6% de los pacientes con IGU y nunca en el grupo control. La cantidad encontrada de estas estructuras fue escasa en el 23,8%, moderada en el 8,8% y llegaron a ser numerosas sólo en 2 casos de pacientes (2,5%). Los cuerpos amiláceos se observaron en el 42,9% de los casos del grupo 4, en el 38,7% de los casos del grupo 3 (ambos grupos incluyeron casos de cuerpos amiláceos en cantidad abundante) y en el 36,4% de los casos del grupo 1 y 25,4% de los casos del grupo 2. La presencia de filamentos irregulares fue superior en todos los grupos frente al control, pero no hubo una diferencia en grado estadísticamente significativo ( $p=0,166$ ;  $\chi^2$  de Pearson). (Tabla IXa).



### Cuerpos amiláceos



**Figura 36.** Cuerpos amiláceos presentes en el líquido seminal. Estructuras ovoides o poliédricas con las características formaciones laminares concéntricas. Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

**Tabla IXa.** Cambios inflamatorios observados en los cortes semifinos del líquido seminal.

|  | Grupos                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|--|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|  | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Número de leucocitos presentes</b>          |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 64(80)                                | 19(86,4)                | 11(84,6)                | 24(77,4)                | 10(71,4)                |
| Escasos (1-2)                                  | 0(0)                     | 9(11,3)                               | 2(9,1)                  | 2(15,4)                 | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| Moderados (3-5)                                | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 0(0)                    |
| Abundantes (6-10)                              | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| Muy abundantes (11 o más)                      | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 2(14,3)                 |
| <b>Leucocitos con inclusiones bacterianas</b>  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 66(82,5)                              | 19(86,4)                | 12(92,3)                | 25(80,6)                | 10(71,4)                |
| Escasos (1-2)                                  | 0(0)                     | 4(5)                                  | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 2(14,3)                 |
| Moderado                                       | 0(0)                     | 7(8,8)                                | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 4(12,9)                 | 0(0)                    |
| Abundante                                      | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Muy abundante                                  | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| <b>Leucocitos con fagocitosis inespecífica</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 67(83,8)                              | 19(86,4)                | 12(92,3)                | 26(83,9)                | 10(71,4)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 2(14,3)                 |
| Moderados                                      | 0(0)                     | 4(5)                                  | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 3(9,7)                  | 0(0)                    |
| Abundantes                                     | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes                                 | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| <b>Leucocitos con fagocitosis espermática</b>  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes                                       | 10(100)                  | 71(88,8)                              | 20(90,9)                | 12(92,3)                | 27(87,1)                | 12(85,7)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 7(8,8)                                | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 2(14,3)                 |
| Moderados                                      | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| <b>Número de fagocitos</b>                     |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes                                       | 10(100)                  | 3(3,8)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Escasos  | 0(0)                     | 15(18,8)                              | 4(18,2)                 | 4(30,8)                 | 4(12,9)                 | 3(21,4)                 |
| Moderados                                      | 0(0)                     | 29(36,3)                              | 8(36,4)                 | 4(30,8)                 | 14(45,2)                | 3(21,4)                 |
| Abundantes                                     | 0(0)                     | 21(26,3)                              | 9(40,9)                 | 3(23,1)                 | 7(22,6)                 | 2(14,3)                 |
| Muy abundantes                                 | 0(0)                     | 12(15)                                | 0(0)                    | 2(15,4)                 | 5(16,1)                 | 5(35,7)                 |

**Tabla IXa (continuación).** Cambios inflamatorios observados en los cortes semifinos del líquido seminal.

|  |                          | Grupos                                |                         |                         |                         |                         |
|--|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|  | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Fagocitos activos</b>                             |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 4(5)                                  | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Escasos  | 0(0)                     | 14(17,5)                              | 4(18,2)                 | 4(30,8)                 | 3(9,7)                  | 3(21,4)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 36(45)                                | 10(4,5)                 | 7(53,8)                 | 17(54,8)                | 2(14,3)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 18(22,5)                              | 6(27,3)                 | 1(7,7)                  | 7(22,6)                 | 4(28,6)                 |
| Muy abundantes                                       | 0(0)                     | 8(10)                                 | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 3(9,7)                  | 4(28,6)                 |
| <b>Fagocitos inactivos</b>                           |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 68(85)                                | 19(86,4)                | 9(69,2)                 | 27(87,1)                | 13(92,9)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 9(11,3)                               | 2(9,1)                  | 4(30,8)                 | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| Moderados  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| Abundantes   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Fagocitos con inclusiones bacterianas</b>         |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 7(70)                    | 6(7,5)                                | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 2(14,3)                 |
| Escasos  | 3(30)                    | 26(32,5)                              | 9(40,9)                 | 7(53,8)                 | 8(25,8)                 | 2(14,3)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 25(31,3)                              | 8(36,4)                 | 3(23,1)                 | 10(32,3)                | 4(28,6)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 13(16,3)                              | 2(9,1)                  | 2(15,4)                 | 7(22,6)                 | 2(14,3)                 |
| Muy abundantes                                       | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 5(16,1)                 | 4(28,6)                 |
| <b>Macrófagos con fagocitosis inespecifica</b>       |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 6(7,5)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 32(40)                                | 9(40,9)                 | 7(53,8)                 | 12(38,7)                | 4(28,6)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 27(33,8)                              | 11(50)                  | 4(30,8)                 | 9(29,0)                 | 3(21,4)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 1(4,5)                  | 2(15,4)                 | 4(12,9)                 | 3(21,4)                 |
| Muy abundantes                                       | 0(0)                     | 5(6,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| <b>Macrófagos con fagocitosis de espermatozoides</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 12(15)                                | 2(9,1)                  | 2(15,4)                 | 6(19,4)                 | 2(14,3)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 40(50)                                | 14(63,6)                | 5(38,5)                 | 15(48,4)                | 6(42,9)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 22(27,5)                              | 6(27,3)                 | 6(46,2)                 | 5(16,1)                 | 5(35,7)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 4(5)                                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 4(12,9)                 | 0(0)                    |
| Muy abundantes                                       | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Espermiófagos gigantes</b>                        |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 43(53,8)                              | 18(81,8)                | 8(61,5)                 | 12(38,7)                | 5(35,7)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 20(25)                                | 0(0)                    | 3(23,1)                 | 13(41,9)                | 4(28,6)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 11(13,8)                              | 3(13,6)                 | 2(15,4)                 | 3(9,7)                  | 3(21,4)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes                                       | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Macrófagos con bacterias adheridas</b>            |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 3(3,8)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Escasos  | 0(0)                     | 27(33,8)                              | 7(31,8)                 | 8(61,5)                 | 8(25,8)                 | 4(28,6)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 27(33,8)                              | 9(40,9)                 | 3(23,1)                 | 10(32,3)                | 5(35,7)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 17(21,3)                              | 4(18,2)                 | 2(15,4)                 | 9(29)                   | 2(14,3)                 |
| Muy abundantes                                       | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| <b>Presencia de células epiteliales</b>              |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 8(80)                    | 11(13,8)                              | 2(9,1)                  | 2(15,4)                 | 6(19,4)                 | 1(7,1)                  |
| Escasos  | 2(20)                    | 27(33,8)                              | 4(18,2)                 | 7(53,8)                 | 11(35,5)                | 5(35,7)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 21(26,3)                              | 8(36,4)                 | 2(15,4)                 | 8(25,8)                 | 3(21,4)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 11(13,8)                              | 4(18,2)                 | 2(15,4)                 | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| Muy abundantes                                       | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 4(18,2)                 | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 3(21,4)                 |

**Tabla IXa (continuación).** Cambios inflamatorios observados en los cortes semifinos del líquido seminal.

|   | Grupos                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|---|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|   | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Células epiteliales con inclusiones bacterianas</b>    |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 14(17,5)                              | 4(18,2)                 | 3(23,1)                 | 6(19,4)                 | 1(7,1)                  |
| Escasos   | 0(0)                     | 34(42,5)                              | 9(40,9)                 | 4(30,8)                 | 13(41,9)                | 8(57,1)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 16(20)                                | 5(22,7)                 | 3(23,1)                 | 6(19,4)                 | 2(14,3)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 11(13,8)                              | 3(13,6)                 | 2(15,4)                 | 5(16,1)                 | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 5(6,3)                                | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 2(14,3)                 |
| <b>Células epiteliales con autólisis</b>                  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 19(23,8)                              | 4(18,2)                 | 3(23,1)                 | 9(29)                   | 3(21,4)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 31(38,8)                              | 10(45,5)                | 8(61,5)                 | 9(29)                   | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 20(25)                                | 5(22,7)                 | 1(7,7)                  | 10(32,3)                | 4(28,6)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 9(11,3)                               | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 3(9,7)                  | 3(21,4)                 |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Células epiteliales con bacterias adheridas</b>        |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 17(21,3)                              | 4(18,2)                 | 4(30,8)                 | 7(22,6)                 | 2(14,3)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 28(35)                                | 10(45,5)                | 6(46,2)                 | 8(25,8)                 | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 23(28,8)                              | 4(18,2)                 | 2(15,4)                 | 12(38,7)                | 5(35,7)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 4(18,2)                 | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Presencia de restos citoplasmáticos</b>                |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 7(70)                    | 4(5)                                  | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Escasos   | 3(30)                    | 18(22,5)                              | 5(22,7)                 | 2(15,4)                 | 6(19,4)                 | 5(35,7)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 20(25)                                | 7(31,8)                 | 3(23,1)                 | 7(22,6)                 | 3(21,4)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 14(17,5)                              | 4(18,2)                 | 3(23,1)                 | 7(22,6)                 | 0(0)                    |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 24(30)                                | 4(18,2)                 | 4(30,8)                 | 10(32,3)                | 6(42,9)                 |
| <b>Restos citoplasmáticos con inclusiones bacterianas</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 4(5)                                  | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Escasos   | 0(0)                     | 27(33,8)                              | 8(36,4)                 | 6(46,2)                 | 8(25,8)                 | 5(35,7)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 31(38,8)                              | 8(36,4)                 | 3(23,1)                 | 16(51,6)                | 4(28,6)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 13(16,3)                              | 2(9,1)                  | 3(23,1)                 | 4(12,9)                 | 4(28,6)                 |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 5(6,3)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Restos citoplasmáticos con bacterias adheridas</b>     |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 9(11,3)                               | 4(18,2)                 | 2(15,4)                 | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| Escasos   | 0(0)                     | 28(35)                                | 8(36,4)                 | 4(30,8)                 | 10(32,3)                | 6(42,9)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 28(35)                                | 5(22,7)                 | 5(38,5)                 | 14(45,2)                | 4(28,6)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 2(9,1)                  | 2(15,4)                 | 4(12,9)                 | 2(14,3)                 |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 5(6,3)                                | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Presencia de <i>detritus</i> celulares</b>             |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Escasos   | 7(70)                    | 10(12,5)                              | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 6(19,4)                 | 1(7,1)                  |
| Moderados   | 3(30)                    | 24(30)                                | 4(18,2)                 | 5(38,5)                 | 9(29)                   | 6(42,9)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 25(31,3)                              | 7(31,8)                 | 5(38,5)                 | 9(29)                   | 4(28,6)                 |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 21(26,3)                              | 8(36,4)                 | 3(23,1)                 | 7(22,6)                 | 3(21,4)                 |
| <b>Presencia de filamentos irregulares</b>                |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 34(42,5)                              | 5(22,7)                 | 6(46,2)                 | 16(51,6)                | 7(50)                   |
| Escasos   | 0(0)                     | 36(45)                                | 13(59,1)                | 6(46,2)                 | 13(41,9)                | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 5(6,3)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 2(14,3)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Presencia de cuerpos amiláceos</b>                     |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 52(65)                                | 14(63,6)                | 11(84,6)                | 19(61,3)                | 8(57,1)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 19(23,8)                              | 5(22,7)                 | 2(15,4)                 | 10(32,3)                | 2(14,3)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 7(8,8)                                | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 3(21,4)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |

**Tabla IXb.** Resultados de la Inmunofluorescencia directa aplicada al concentrado celular incluido en epoxiresina.

|   | Inmunofluorescencia |          | Total | <i>p</i> |
|---|---------------------|----------|-------|----------|
|   | Directa             |          |       |          |
|   | Negativo            | Positivo |       |          |
| Presencia de leucocitos en el corte semifino                        |                     |          |       |          |
| Ausente   | 25                  | 39       | 64    | 0,189    |
| Escaso  | 3                   | 6        | 9     |          |
| Moderado  | 3                   | 0        | 3     |          |
| Abundante   | 1                   | 0        | 1     |          |
| Muy abundante   | 1                   | 2        | 3     |          |
| Leucocitos con inclusiones bacterianas                              |                     |          |       |          |
| Ausente   | 25                  | 39       | 64    | 0,451    |
| Escaso  | 2                   | 4        | 6     |          |
| Moderado  | 5                   | 2        | 7     |          |
| Abundante   | 1                   | 1        | 2     |          |
| Muy abundante   | 0                   | 1        | 1     |          |
| Fagocitos con inclusiones bacterianas                               |                     |          |       |          |
| Ausente   | 3                   | 3        | 6     | 0,482    |
| Presente  | 30                  | 44       | 74    |          |
| Fagocitos con bacterias adheridas                                   |                     |          |       |          |
| Ausente   | 2                   | 1        | 3     | 0,362    |
| Presente  | 31                  | 46       | 77    |          |
| Células epiteliales con inclusiones visibles                        |                     |          |       |          |
| Ausente   | 7                   | 7        | 14    | 0,330    |
| Presente  | 26                  | 40       | 66    |          |
| Células epiteliales con bacterias adheridas                         |                     |          |       |          |
| Ausente   | 9                   | 8        | 17    | 0,204    |
| Presente  | 24                  | 39       | 63    |          |
| Células redondas con inclusiones bacterianas                        |                     |          |       |          |
| Ausente   | 1                   | 3        | 4     | 0,451    |
| Presente  | 32                  | 44       | 76    |          |
| Restos citoplasmáticos con bacterias adheridas                      |                     |          |       |          |
| Ausente   | 2                   | 7        | 9     | 0,194    |
| Presente  | 31                  | 40       | 71    |          |
| Cuerpos reticulares de clamidia                                     |                     |          |       |          |
| Ausente   | 11                  | 10       | 21    | 0,171    |
| Presente  | 22                  | 37       | 59    |          |
| Cuerpos reticulares dentro de células redondas                      |                     |          |       |          |
| Ausente   | 20                  | 26       | 46    | 0,406    |
| Presente  | 13                  | 21       | 34    |          |
| Cuerpos reticulares en el citoplasma de células epiteliales         |                     |          |       |          |
| Ausente   | 29                  | 38       | 67    | 0,302    |
| Presente  | 4                   | 9        | 13    |          |
| Cuerpos reticulares en el citoplasma de macrófagos                  |                     |          |       |          |
| Ausente   | 15                  | 18       | 33    | 0,341    |
| Presente  | 18                  | 29       | 47    |          |
| Número de cuerpos elementales de clamidia observados en el semifino |                     |          |       |          |
| Ausente   | 0                   | 0        | 0     | 0,587    |
| Presente  | 33                  | 47       | 80    |          |
| Cuerpos elementales adheridos a células redondas                    |                     |          |       |          |
| Ausente   | 10                  | 26       | 36    | 0,023    |
| Presente  | 23                  | 21       | 44    |          |
| Número de cuerpos elementales dentro de células redondas            |                     |          |       |          |
| Ausente   | 6                   | 9        | 15    | 0,576    |
| Presente  | 27                  | 38       | 65    |          |
| Número de cuerpos elementales adheridos a células epiteliales       |                     |          |       |          |
| Ausente   | 19                  | 29       | 48    | 0,444    |
| Presente  | 14                  | 18       | 32    |          |

**Tabla IXb Continuación. Resultados de la Inmunofluorescencia directa aplicada al concentrado celular incluido en parafina.**

|   |          | Inmunofluorescencia |          | Total | p     |
|---|----------|---------------------|----------|-------|-------|
|   |          | Directa             |          |       |       |
|   |          | Negativo            | Positivo |       |       |
| Número de cuerpos elementales en el citoplasma de las células epiteliales |          |                     |          |       |       |
|   | Ausente  | 16                  | 17       | 33    | 0,192 |
|   | Presente | 17                  | 30       | 47    |       |
| Número de cuerpos elementales en el citoplasma de los leucocitos          |          |                     |          |       |       |
|   | Ausente  | 29                  | 45       | 74    | 0,188 |
|   | Presente | 4                   | 2        | 6     |       |
| Número de cuerpos elementales adheridos a macrófagos                      |          |                     |          |       |       |
|   | Ausente  | 17                  | 22       | 39    | 0,426 |
|   | Presente | 16                  | 25       | 41    |       |
| Número de cuerpos elementales en el citoplasma de macrófagos              |          |                     |          |       |       |
|   | Ausente  | 11                  | 6        | 17    | 0,027 |
|   | Presente | 22                  | 41       | 63    |       |
| Número de cuerpos elementales asociados a <i>detritus</i> celulares       |          |                     |          |       |       |
|   | Ausente  | 6                   | 12       | 18    | 0,310 |
|   | Presente | 27                  | 35       | 62    |       |
| Numero de cuerpos elementales dentro de los espermatozoides               |          |                     |          |       |       |
|   | Ausente  | 6                   | 14       | 20    | 0,180 |
|   | Presente | 27                  | 33       | 60    |       |

### 5.3.2 Presencia de Bacterias

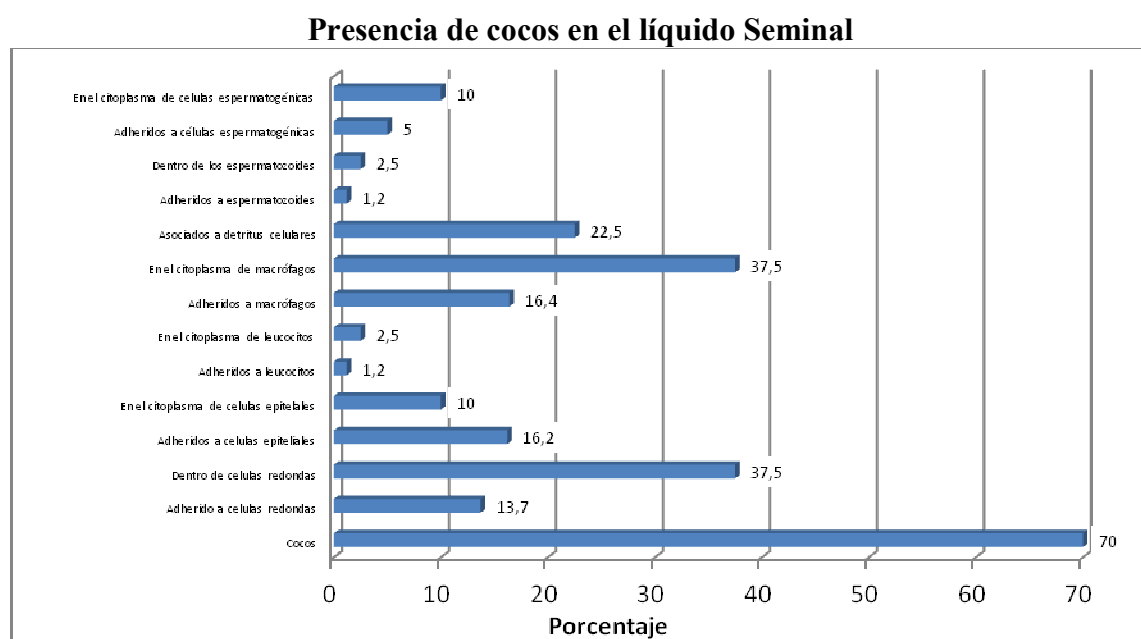
#### 5.3.2.1 Cocos

La presencia de bacterias esféricas de 3 a 5 micras de diámetro pudo ser observada en las secciones semifinas del “*pellet*” seminal en el 70% de los pacientes con IGU. En el 42,8%, la concentración de cocos se estimó como escasa, en el 10% como moderada, en el 7,5% fue abundante y sólo en el 3,8% fueron muy abundantes. Al comparar este aspecto entre los diferentes grupos de pacientes, se encontró que el grupo 1 fue el que presentó la mayor proporción de casos con cocos: 83,3%, seguido de los grupos 3 (77,7%), 4 (74,5%) y 2 (70,2%). Tabla X, Figuras 37 y 38.

Respecto a la cantidad en la que fueron observados los cocos, la concentración fue predominantemente escasa en todos los grupos con un promedio para todos ellos de 48,8%, y en menor proporción (10%), moderada; sólo se registraron en concentración abundante o muy abundante en 9 casos: 4 del grupo 3, 2 del grupo 1, 2 del grupo 4 y 1 del grupo 2. Tabla X, Figuras 37 y 38.

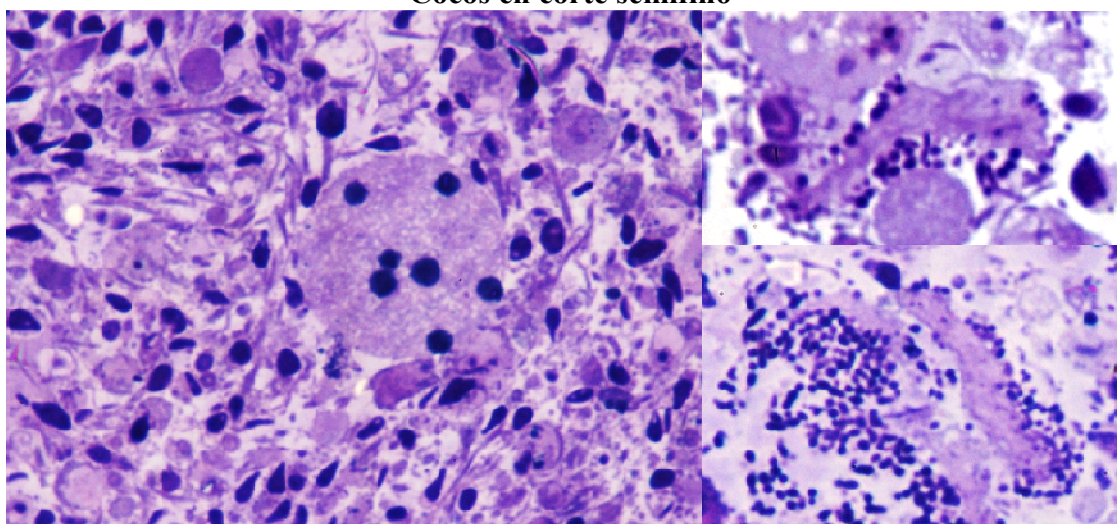
El 13,7% de los pacientes presentaron cocos adheridos a la superficie de restos citoplásmicos y en una proporción mayor de pacientes (46,5%), se vieron dentro de los restos citoplásmicos. También se observaron cocos adheridos a las células epiteliales en el 16,2% de los pacientes o dentro de su citoplasma en el 10% de los casos. En una pequeña

proporción de casos se observaron cocos adheridos a los leucocitos y dentro de su citoplasma (1,2 y 1,5%, respectivamente). Tabla X, Figuras 37 y 38.



**Figura 37.** Presencia Cocos observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

### Cocos en corte semifino



**Figura 38.** Bacterias cocoides adheridas a células epiteliales, en el interior de restos celulares y libres en el espacio extracelular (Flecha). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

**Tabla X.** Presencia de bacterias en forma de cocos en el corte semifino del líquido seminal.

|  | Grupos                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|--|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|  | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Número de cocos</b>                               |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 24(30,0)                              | 5(22,7)                 | 4(30,8)                 | 10(32,3)                | 5(35,7)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 39(48,8)                              | 14(36,6)                | 7(35,8)                 | 13(41,9)                | 5(35,7)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 8(10)                                 | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 4(12,9)                 | 2(14,3)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes                                       | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Cocos adheridos a células redondas</b>            |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 69(86,3)                              | 17(77,3)                | 12(92,3)                | 27(87,1)                | 13(92,9)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 5(22,7)                 | 1(7,7)                  | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| Moderado   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Cocos dentro de células redondas</b>              |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 50(62,5)                              | 16(72,7)                | 8(61,5)                 | 18(58,1)                | 8(57,1)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 25(31,3)                              | 6(27,3)                 | 4(30,8)                 | 10(32,3)                | 5(35,7)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 4(5)                                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| Abundantes   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cocos adheridos a células epiteliales</b>         |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 67(83,8)                              | 20(90,9)                | 11(84,6)                | 26(83,9)                | 10(71,4)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 3(21,4)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| Abundantes   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Muy abundantes                                       | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| <b>Cocos en el citoplasma de células epiteliales</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 72(90)                                | 21(9,5)                 | 13(100)                 | 25(80,6)                | 13(92,9)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 4(5)                                  | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| Moderados  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| Abundantes   | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| <b>Cocos adheridos a leucocitos</b>                  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 79(98,8)                              | 21(95,5)                | 13(100)                 | 31(100)                 | 14(100)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cocos en el citoplasma de leucocitos</b>          |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 78(97,5)                              | 21(95,5)                | 12(92,3)                | 31(100)                 | 14(100)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cocos adheridos a macrófagos</b>                  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 69(83,6)                              | 16(72,7)                | 11(84,6)                | 29(93,5)                | 13(92,9)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 9(11,3)                               | 5(22,7)                 | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| Moderados  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cocos en el citoplasma de macrófagos</b>          |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 50(62,5)                              | 12(54,5)                | 7(53,8)                 | 22(71)                  | 9(64,3)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 25(31,3)                              | 8(36,4)                 | 5(38,5)                 | 7(22,6)                 | 5(35,7)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Abundantes   | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Cocos asociados a <i>destritus</i> celulares</b>  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 62(77,5)                              | 17(77,3)                | 10(76,9)                | 26(83,9)                | 9(64,3)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 13(16,3)                              | 4(18,2)                 | 2(15,4)                 | 5(16,1)                 | 2(14,3)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 4(5)                                  | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 3(21,4)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cocos adheridos a espermatozoides</b>             |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 79(98,8)                              | 22(100)                 | 13(100)                 | 30(96,8)                | 14(100)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |

**Tabla X (continuación).** Presencia de bacterias en forma de cocos en el corte semifino del líquido seminal

|  | Grupos                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|--|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|  | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Cocos dentro de los espermatozoides</b>               |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 78(97,5)                              | 22(100)                 | 13(100)                 | 29(93,5)                | 14(100)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Muy abundantes   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Cocos adheridos a células espermatozoides</b>         |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 76(95)                                | 22(100)                 | 13(100)                 | 27(87,1)                | 14(100)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 4(5)                                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 4(12,9)                 | 0(0)                    |
| <b>Cocos en el citoplasma de células espermatozoides</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 72(90)                                | 20(90,9)                | 13(100)                 | 26(83,9)                | 13(92,9)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| Moderados  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |

Comparativamente, en un número algo mayor de casos, el 16,4%, los cocos se presentaron adheridos a los macrófagos, pero sobre todo dentro de su citoplasma, observándose este rasgo en el 37,5% de los pacientes. La presencia de cocos adheridos a la superficie de macrófagos fue un rasgo que se calificó como escaso en el 16,4% de los pacientes y moderado (en el 2,5% de los casos). La observación de cocos dentro del citoplasma de macrófagos en cantidad moderada a abundante se registró en el 6,3% de los pacientes, considerándose escasa en el 37,5%. El mayor número de pacientes con cocos en el citoplasma de los macrófagos estaban presentes en los grupos 1 y 2. Tabla X, Figuras 37 y 38.

Los cocos también se observaron asociados a *detritus* celulares en el 22,5% de los pacientes, y en pocas ocasiones (2,5% de los casos) se vieron adheridos a los espermatozoides. En dos casos del grupo 3 hubo imágenes sugestivas de la presencia dentro del espermatozoide de cocos. En presencia de células espermatozoides, 5% de los pacientes mostraron cocos adheridos a su superficie y en el 10% se encontraron incluidos en su citoplasma. Tabla X, Figuras 37 y 38.

El análisis comparativo realizado entre los grupos de pacientes de acuerdo al diagnóstico microbiológico, respecto a la presencia de cocos, su concentración y localización con relación a los elementos citológicos del proceso inflamatorio realizado, arrojó resultados que fueron estadísticamente significativos para las variables: número de cocos en el citoplasma de células epiteliales y número de cocos asociados a *detritus*



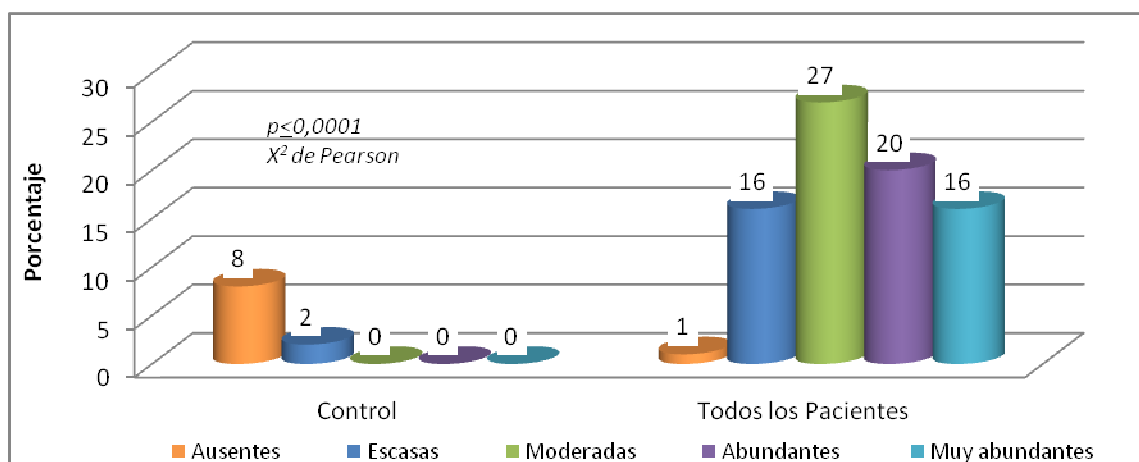
celulares ( $p \leq 0,05$ ; Fisher). Para el resto de las variables analizadas en éste capítulo no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

### 5.3.2.2 Bacterias Pleomórficas

#### 5.3.2.2.1 Concentración

Partículas bacterianas de forma esférica o bacilar, con diámetro de 0,2 micras, compatibles por su forma y dimensiones con bacterias pleomórficas (BPM) de la especie *Mycoplasma* (Fig. 26) se observaron en un alto porcentaje de los casos de pacientes (98,7%) y sólo en dos casos de los voluntarios del grupo control, y en estos, la concentración de BPM fue escasa. En el 20% del número global de pacientes con IGU, las BPM fueron escasas o moderadas en el 33,8%, abundantes en el 25% y muy abundantes en el 20% (Tabla XI, Figura 39). El número de BPM presentes en los cortes semifinos del líquido seminal fue estadísticamente superior en todos los grupos de pacientes con IGU estudiados ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson), con respecto al grupo control.

#### Concentración de bacterias pleomórficas

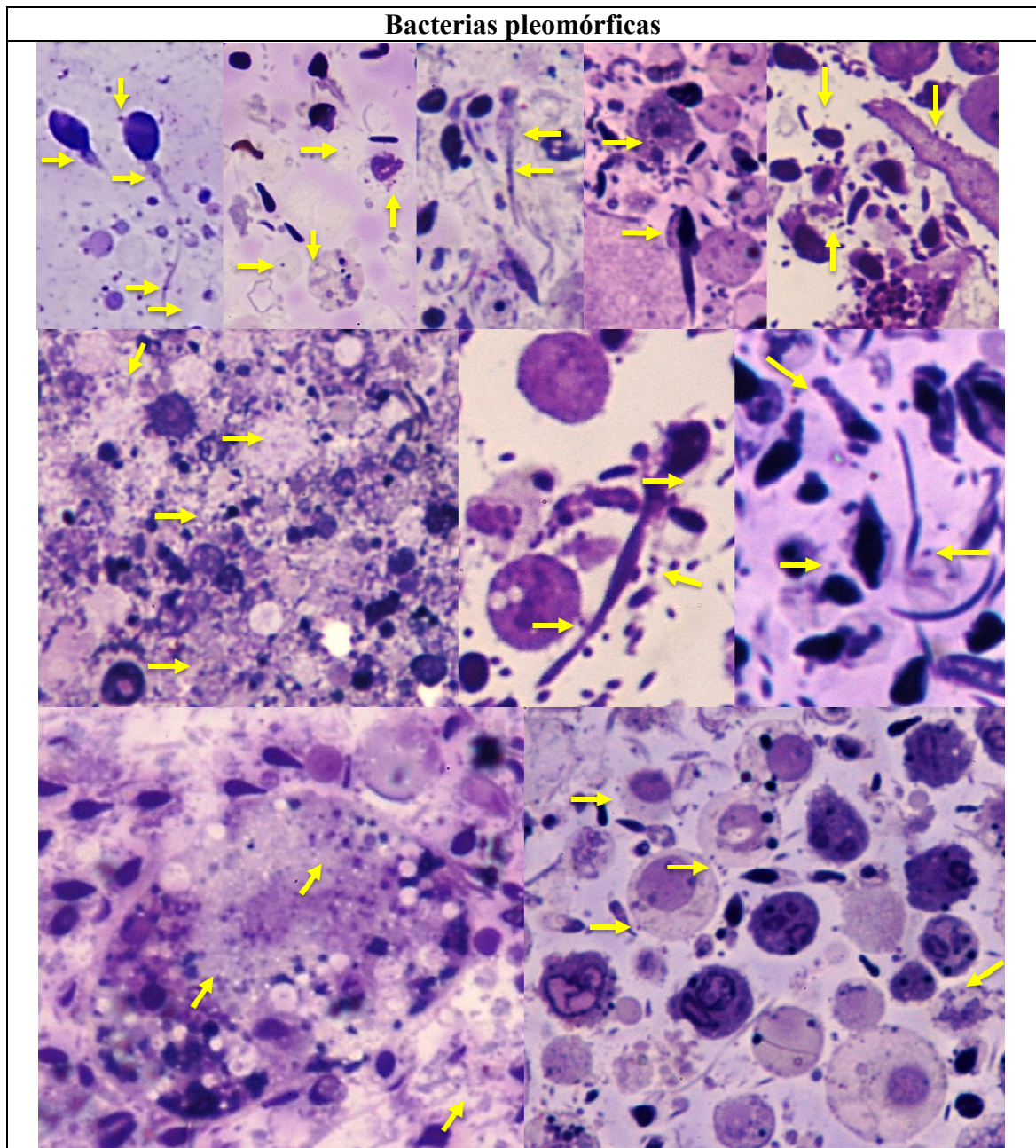


**Figura 39.** Concentración de bacterias pleomórficas observadas presentes en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

La apreciación de BPM en concentración moderada a muy abundante fue vista en todos menos en uno de los casos del grupo de IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.* (95,5%) y en 26 de 31 de los pacientes con diagnóstico de IGU por *Mycoplasma spp.* (80,7%). En la misma medida se observaron estas partículas bacterianas en 64,3% y 61,5% de los casos del grupo 4 y del grupo 2 respectivamente. (Tabla XI).

### 5.3.2.2.2 Adheridas a Restos Citoplásmicos

En el 64,7% de los pacientes se observaron bacterias pleomórficas adheridas a la superficie de restos citoplásmicos procedentes, tanto de espermatozoides maduros como de células germinales inmaduras, aunque estas últimas son de difícil tipificación debido a sus cambios degenerativos. Los restos citoplásmicos pueden ser igualmente, el resultado de la degeneración de células inflamatorias o de células epiteliales (Figura 40).

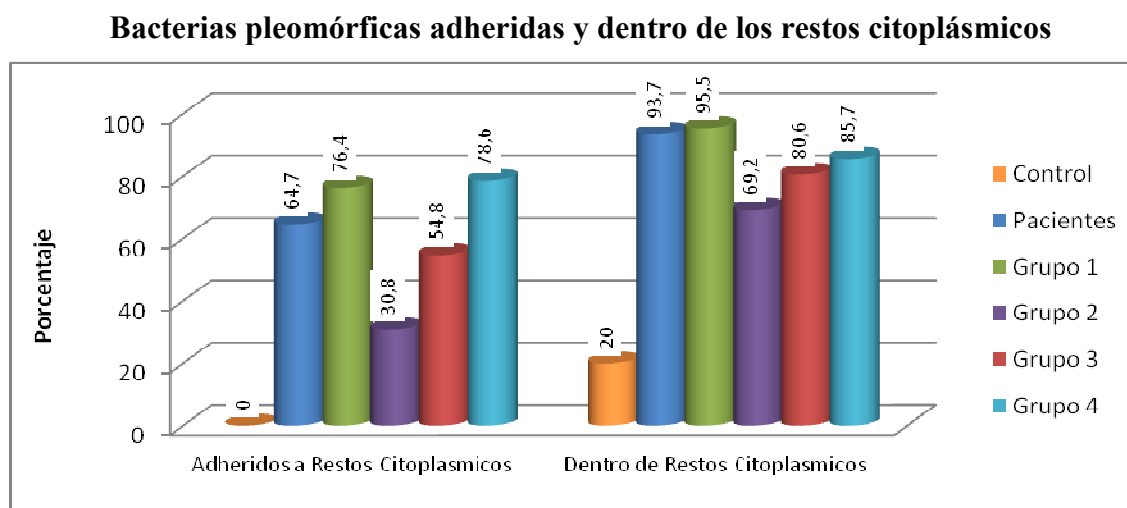


**Figura 40.** Numerosas partículas basófilas de diámetro menor a 300 nm, de forma esférica u ovoide de contorno poco definido se observaron ampliamente distribuidas libres en el plasma seminal, adheridas a espermatozoides y dentro del citoplasma de la pieza media del mismo. Se vieron también adheridas y en el citoplasma de los restos celulares, de las células inflamatorias y de las células epiteliales, además de encontrarse inmersas en áreas de detritus celulares (flechas). Corte semifino, azul de toluidina, 100x, campo claro.

En el 51,3%, la concentración de bacterias adheridas a restos citoplásmicos fue escasa, siendo moderada o abundante en el 12,6% de los casos. El número mayor de pacientes con este patrón de localización de las BPM pertenecieron al grupo 1, (81,8% de los 22 casos del grupo), y al grupo 4, en el que 13 de los 14 pacientes del grupo presentaron ésta característica morfológica (Tabla XI, Figura 41). La comparación del hallazgo de BPM adheridas a restos celulares fue significativamente mayor para el grupo de pacientes comparado con el grupo control ( $p=0,005$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

### 5.3.2.2.3 En el Interior de los Restos Citoplásmicos

En el 97,3% de los pacientes y en el 20% de los casos del grupo control se encontraron BPM dentro de los restos citoplásmicos (Figura 40), considerándose su presencia en escasa a moderada cantidad en la mayoría de ellos (77,5%). Esta observación fue hecha en el 95,5% de los pacientes del grupo 1 con IGU por Clamidia y Mycoplasma, en el 69,2% del grupo 2, en el 80,6% del grupo 3 y en el 85,7% del grupo 4 (Tabla XI, Figura 41).



**Figura 41.** Porcentaje de pacientes con bacterias pleomórficas adheridas y dentro de los restos citoplásmicos observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

La comparación del hallazgo de BPM en el citoplasma de los restos celulares fue significativamente mayor para el grupo de pacientes comparado con el grupo control ( $p\leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

#### 5.3.2.2.4 Adheridas a Células Epiteliales

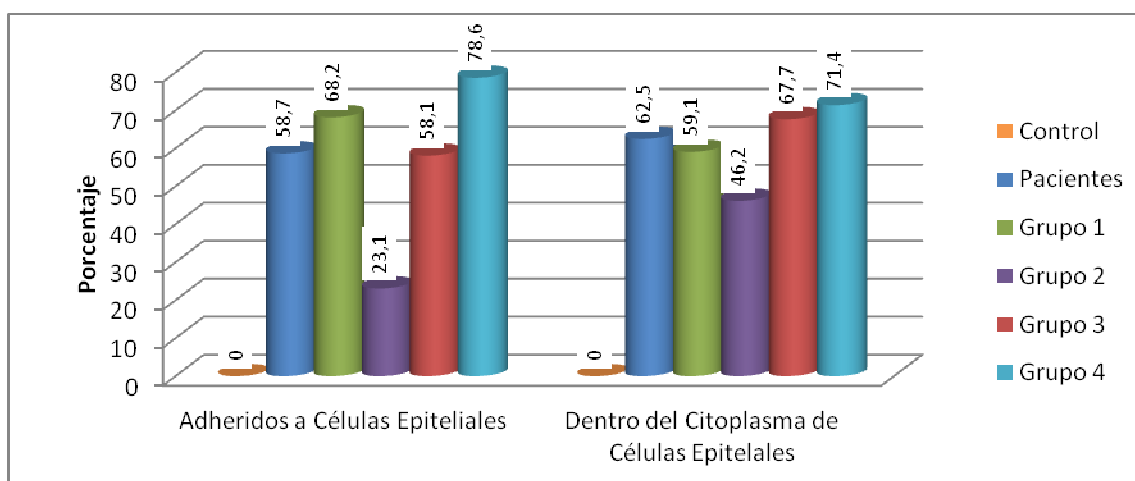
La presencia de BPM adheridas a la superficie de células epiteliales (Figura 40), fue observada en el 58,7% de los casos de pacientes y no se observó en ninguno de los casos del grupo control ( $p=0,005$ ;  $\chi^2$  de Pearson). En el 30% de los pacientes, este hallazgo se encontró en escasa cantidad. En el 21,3% en cantidad moderada, en el 5% en cantidad abundante y en el 2,5% en cantidad muy abundante. El grupo en el que fue más frecuente encontrar células epiteliales con bacterias adheridas a su superficie fue el 4 donde el 78,6% de los pacientes fueron positivos para esta observación, le siguió en frecuencia el grupo 1 con 68,2% de casos positivos y el grupo 3 con 58,1% de positivos (Tabla XI, Figura 42).

#### 5.3.2.2.5 En el Citoplasma de Células Epiteliales

En el grupo de pacientes con IGU, se observaron BPM en el interior del citoplasma de las células epiteliales presentes en el líquido seminal (Figura 40), con una frecuencia algo mayor (62,5%) que el grupo control ( $p=0,015$ ;  $\chi^2$  de Pearson). En el 56,3%, la cantidad de células epiteliales con bacterias fue escasa o moderada y en un 6,3% fue abundante o muy abundante. Estas observaciones fueron más frecuentes en los grupos 4 (71,4%) y 3 (67,7%). Tabla XI, Figura 42.

Los grupos 1, 2, 3 y 4 presentaron un aumento significativo ( $p\leq 0,001$ ;  $\chi^2$  de Pearson) de BPM dentro del citoplasma de células epiteliales respecto al grupo control.

#### Bacterias pleomórficas adheridas y en el citoplasma de células epiteliales



**Figura 42.** Porcentaje de pacientes con bacterias pleomórficas adheridas y en el citoplasma de células epiteliales, observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

#### 5.3.2.2.6 Adheridas y en el Citoplasma de Leucocitos

La presencia de BPM adheridas y en el citoplasma de los leucocitos (Figura 40), fue de poca frecuencia en el grupo de pacientes, observándose, respectivamente, en el 2,5% y 6,2% de los casos, y estando en la mayoría de los líquidos seminales estudiados en cantidad escasa. Estas observaciones no fueron mayores en frecuencia en el grupo de pacientes que en el grupo control ( $p=0,06$ ;  $\chi^2$  de Pearson). En cambio, la presencia de BPM adheridas o en el citoplasma de macrófagos fue un rasgo de mayor frecuencia, ya que, respectivamente, se observaron en el 53,7% y 77,5% de los pacientes y ambos hallazgos fueron estadísticamente significativos ( $p=0,016$ ;  $\chi^2$  de Pearson y  $p\leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson) para cada una de esas dos características. Tabla XI.

#### 5.3.2.2.7 Adheridas y en el Citoplasma de Macrófagos

En la mayoría de los pacientes, la presencia de macrófagos con BPM adheridas fue escasa o moderada (en el 52,5% de los casos), siendo más frecuente en el grupo 1 (77,3%).

En el 37,5% de los pacientes, la observación de BPM incluidas en el citoplasma de los macrófagos (Figura 40) fue escasa y en el mismo porcentaje de pacientes del grupo con IGU fue moderada; en el 10% fue abundante o marcada y en el 2,5% muy abundante. Los grupos de pacientes en los que con mayor frecuencia se observó este cambio fueron en el grupo 2 (100%) y el grupo 1 (95,5%). Tabla XI.

#### 5.3.2.2.8 En el Área de Detritus

Las bacterias compatibles morfológicamente con la especie *Mycoplasma* fueron encontradas también con frecuencia en el área de *detritus* celulares (Figura 40) Imágenes de este tipo fueron observadas en el 87,5% de los casos de pacientes y no se encontraron en ninguno de los casos del grupo control, siendo ésta diferencia estadísticamente significativa ( $p\leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson). La cantidad de BPM en áreas de *detritus* fue observada en cantidad escasa a moderada en el 60% de los casos de pacientes. Los grupos de pacientes en los que estas observaciones fueron más frecuentes incluyeron el grupo 1 (95,5%) y el grupo 2 (84,5%). Tabla XI.

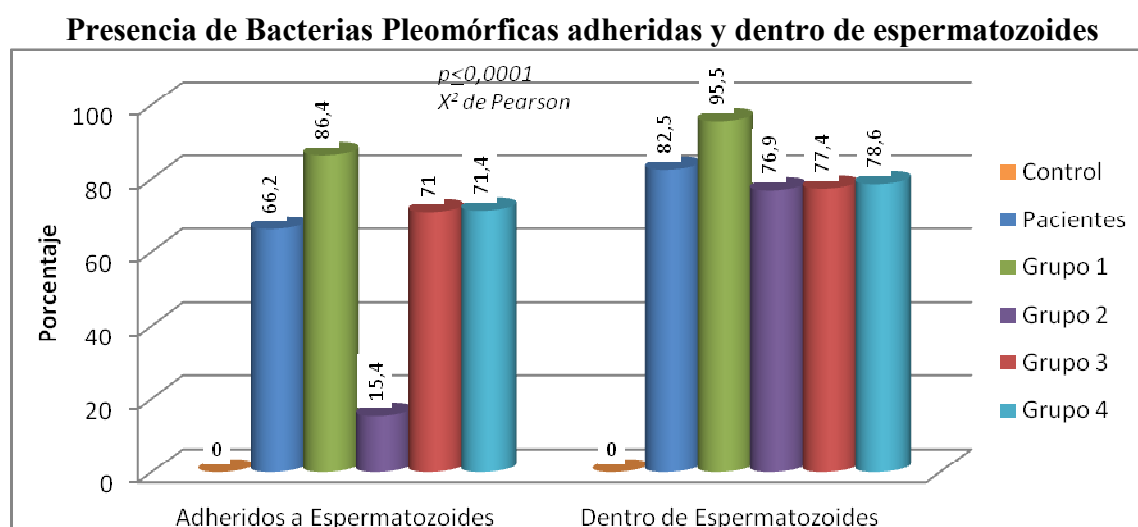
#### 5.3.2.2.9 Adheridas a Espermatozoides

La asociación de BPM con los espermatozoides fue muy frecuente en el grupo de pacientes y no se observó en el grupo de casos control ( $p=0,001$ ;  $\chi^2$  de Pearson). En el

66,2% de los pacientes se vieron adheridas al flagelo del espermatozoide (Figura 40). En 42,5% se consideró como escaso este hallazgo, en el 21,3% se calificó como moderado y en 2,5% de los pacientes fue abundante. El grupo de pacientes en el que se observaron con mayor frecuencia bacterias BPM asociadas a espermatozoides fue el 1(86,4%). Tabla XI y Figura 43.

### 5.3.2.2.10 Dentro de los Espermatozoides

La presencia de BPM, de morfología y dimensiones compatibles con bacterias de la especie *Mycoplasma* en el interior del espermatozoide (Figura 40), se detectó en el 82,5% de los pacientes y no fue observada en el grupo control, existiendo así una diferencia que estadísticamente fue significativa ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Esta característica morfológica se presentó en cantidad escasa en el 31,3% de los pacientes, en cantidad moderada en el 41,3% de los casos, abundante en el 8,8% de los casos y muy abundante en sólo un caso (1,3%). El grupo en el que se presentaron con mayor frecuencia bacterias pleomórficas dentro de los espermatozoides fueron: el grupo 1 con IGU por Clamidia y *Mycoplasma*, donde el 96,5% de los pacientes fueron positivos para este hallazgo; el grupo 3 (76,9%), seguido del grupo 2 (77,9 %) Tabla XI y Figura 43.



**Figura 43.** Porcentaje de pacientes con bacterias pleomórficas adheridas y dentro de los espermatozoides, observadas en los concentrados celulares de líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.



**Tabla XI.** Presencia de bacterias pleomórficas en el corte semifino del líquido seminal.

|   | Grupos                   |                                    |                         |                         |                         |                         |
|---|--------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|   | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80 n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Concentración de bacterias pleomórficas</b>                        |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 8(80)                    | 1(1,3)                             | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Escasos   | 2(20)                    | 16(20)                             | 1(4,5)                  | 5(38,5)                 | 5(16,1)                 | 5(35,7)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 27(33,8)                           | 8(36,4)                 | 1(7,7)                  | 13(41,9)                | 5(35,7)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 20(25)                             | 7(31,8)                 | 4(30,8)                 | 6(19,4)                 | 3(21,4)                 |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 16(20)                             | 6(27,3)                 | 3(23,1)                 | 6(19,4)                 | 1(7,1)                  |
| <b>Bacterias pleomórficas adheridas a restos citoplásmicos</b>        |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 29(36,3)                           | 3(13,6)                 | 9(69,2)                 | 14(45,2)                | 3(21,4)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 41(51,3)                           | 13(59,1)                | 4(30,8)                 | 13(41,9)                | 11(78,6)                |
| Moderados   | 0(0)                     | 9(11,3)                            | 5(22,7)                 | 0(0)                    | 4(12,9)                 | 0(0)                    |
| Abundantes  | 0(0)                     | 1(1,3)                             | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Bacterias pleomórficas en el interior de restos citoplásmicos</b>  |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 8(80)                    | 13(6,3)                            | 1(4,5)                  | 4(30,8)                 | 6(19,4)                 | 2(14,3)                 |
| Escasos   | 2(20)                    | 44(55)                             | 15(68,2)                | 5(38,5)                 | 19(61,3)                | 5(35,7)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 18(22,5)                           | 5(22,7)                 | 2(15,4)                 | 5(16,1)                 | 6(42,9)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 3(3,8)                             | 1(4,5)                  | 2(15,4)                 | 0(0)                    | 0(0)                    |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 2(2,5)                             | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Bacterias pleomórficas adheridas a células epiteliales</b>         |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 33(41,3)                           | 7(31,8)                 | 10(76,9)                | 13(41,9)                | 3(21,4)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 24(30)                             | 7(31,8)                 | 3(23,1)                 | 8(25,8)                 | 6(42,9)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 17(21,3)                           | 8(36,4)                 | 0(0)                    | 5(16,1)                 | 4(28,6)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 4(5)                               | 0(0)                    | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 2(2,5)                             | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| <b>Bacterias pleomórficas en el citoplasma de células epiteliales</b> |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 30(37,5)                           | 9(40,9)                 | 7(53,8)                 | 10(32,3)                | 4(28,6)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 31(38,8)                           | 10(45,5)                | 4(30,8)                 | 13(41,9)                | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 14(17,5)                           | 3(13,6)                 | 1(7,7)                  | 4(12,9)                 | 6(42,9)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 3(3,8)                             | 0(0)                    | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 0(0)                    |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 2(2,5)                             | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Bacterias pleomórficas adheridas a leucocitos</b>                  |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 78(97,5)                           | 22(100)                 | 12(92,3)                | 30(96,8)                | 14(100)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 2(2,5)                             | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Bacterias pleomórficas en el citoplasma de leucocitos</b>          |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 75(93,8)                           | 21(95,5)                | 12(92,3)                | 29(93,5)                | 13(92,9)                |
| Escasos   | 0(0)                     | 4(5)                               | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Moderados   | 0(0)                     | 1(1,3)                             | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Bacterias pleomórficas adheridas a macrófagos</b>                  |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 37(46,3)                           | 5(22,7)                 | 10(76,9)                | 16(51,6)                | 6(42,9)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 24(30)                             | 10(45,5)                | 3(23,1)                 | 8(25,8)                 | 3(21,4)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 18(22,5)                           | 6(27,3)                 | 0(0)                    | 7(22,6)                 | 5(35,7)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 1(1,3)                             | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Bacterias pleomórficas en el citoplasma de macrófagos</b>          |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 10(12,5)                           | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 5(16,1)                 | 4(28,6)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 30(37,5)                           | 7(31,8)                 | 7(53,8)                 | 13(41,9)                | 3(21,4)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 30(37,5)                           | 12(54,5)                | 4(30,8)                 | 8(25,8)                 | 6(42,9)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 8(10)                              | 2(9,1)                  | 2(15,4)                 | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 2(2,5)                             | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| <b>Bacterias pleomórficas asociadas a <i>debris</i> celulares</b>     |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 14(17,5)                           | 1(4,5)                  | 2(15,4)                 | 8(25,8)                 | 3(21,4)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 24(30)                             | 10(45,5)                | 6(46,2)                 | 4(12,9)                 | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 24(30)                             | 5(22,7)                 | 2(15,4)                 | 12(38,7)                | 5(35,7)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 8(10)                              | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 4(12,9)                 | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 10(12,5)                           | 4(18,2)                 | 2(15,4)                 | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Bacterias pleomórficas adheridas a espermatozoides</b>             |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes  | 10(100)                  | 27(33,8)                           | 3(13,6)                 | 11(84,6)                | 9(29)                   | 4(28,6)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 34(42,5)                           | 12(54,5)                | 2(15,4)                 | 13(41,9)                | 7(50)                   |
| Moderados   | 0(0)                     | 17(21,3)                           | 6(27,3)                 | 0(0)                    | 8(25,8)                 | 3(21,4)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 2(2,5)                             | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |

**Tabla XI (continuación).** Presencia de bacterias pleomórficas en el corte semifino del líquido seminal.

|  | Grupos                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|--|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|  | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Bacterias pleomórficas dentro de los espermatozoides</b>                |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 14(17,5)                              | 1(4,5)                  | 3(23,1)                 | 7(22,6)                 | 3(21,4)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 25(31,3)                              | 7(31,8)                 | 5(38,5)                 | 9(29)                   | 4(28,6)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 33(41,3)                              | 11(50)                  | 5(38,5)                 | 12(41,9)                | 4(28,6)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 7(8,8)                                | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 2(14,3)                 |
| Muy abundantes   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| <b>Bacterias pleomórficas adheridas a células espermatogénicas</b>         |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 63(78,8)                              | 15(68,2)                | 13(100)                 | 24(77,4)                | 11(78,6)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 13(16,3)                              | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 7(22,6)                 | 3(21,4)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 4(5)                                  | 4(18,2)                 | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Bacterias pleomórficas en el citoplasma de células espermatogénicas</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausentes   | 10(100)                  | 54(67,5)                              | 14(63,6)                | 12(92,3)                | 20(64,5)                | 8(57,1)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 19(23,8)                              | 4(18,2)                 | 1(7,7)                  | 8(25,8)                 | 6(42,9)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 6(7,5)                                | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 0(0)                    |
| Abundantes   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |

#### 5.3.2.2.11 Adheridas y en el Citoplasma de Células Espermatogénicas

En el 21,2% de los pacientes se encontraron BPM adheridas a células espermatogénicas, 18,9% en cantidad escasa (16,3%) y con más frecuencia en el grupo 3 (22,6%), y en el grupo 4 (21,4%) (Tabla XI). Las BPM también fueron vistas en el citoplasma de las mismas células espermatogénicas en el 22,5% de los pacientes, encontrándose en cantidad escasa o moderada en el 23,8% de los casos y en cantidad abundante o muy abundante en dos casos (1,3%). Los grupos en los que se encontraron mayor número de casos y con mayor acentuación de este rasgo fueron el grupo 1 y el grupo 3 (Tabla XI, Figura 40). Las diferencias de estos porcentajes entre el grupo de pacientes frente al grupo control, no fueron estadísticamente significativas.

#### 5.3.2.2.12 Análisis Estadístico de las Bacterias Pleomórficas por Diagnóstico Microbiológico

El análisis comparativo realizado entre los grupo de pacientes de acuerdo al diagnóstico microbiológico, respecto a la presencia de bacterias pleomórficas, su concentración y localización con relación a los elementos citológicos del proceso inflamatorio realizado, arrojó resultados que fueron estadísticamente significativos, para las variables: número de bacterias pleomórficas en el corte semifino, número de bacterias pleomórficas adheridas a células redondas, número de bacterias pleomórficas adheridas a



células epiteliales y número de bacterias pleomórficas adheridas a células espermatogénicas ( $p \leq 0,05$ ; Fisher).

Para el resto de las variables analizadas en éste capítulo no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

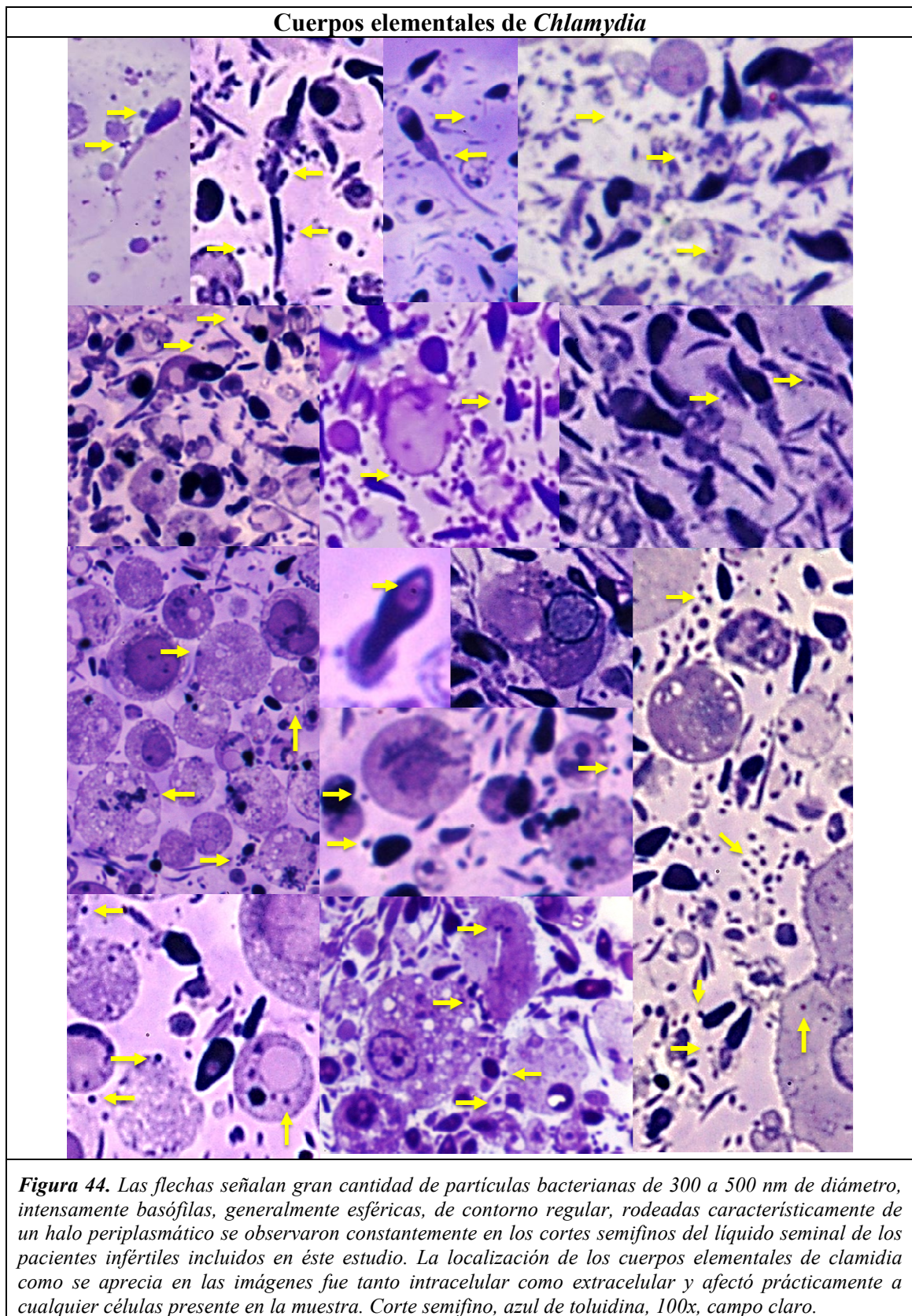
### 5.3.2.3 Cuerpos Elementales de *Chlamydia Trachomatis*

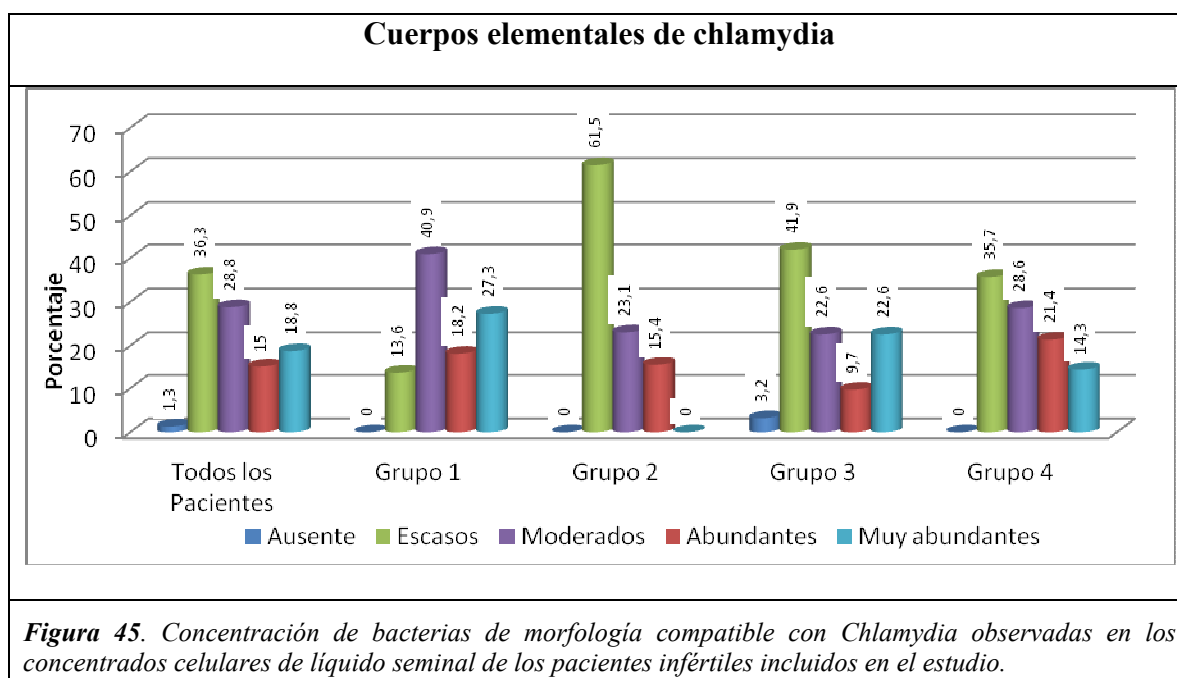
Partículas bacterianas de forma esférica, con diámetro de 0,2 a 0,5 micras, rodeadas de un halo periplasmático característico, fueron consideradas como cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis*, de acuerdo a las descripciones morfológicas existentes de este germen (Figura 44). Estas partículas estuvieron presentes sólo en el grupo de pacientes con IGU y no se observaron en el grupo control ( $p=0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

#### 5.3.2.3.1 Concentración

El porcentaje total de pacientes que presentaron cuerpos elementales de Clamidia fue de 98,7%, observándose en concentración escasa en el 36,3%, moderada en el 28,8%, abundante en el 15% y muy abundantes en el 18,8%. Excepto un caso del grupo sólo *Mycoplasma*, partículas de morfología compatible con cuerpos elementales de Clamidia estuvieron presentes en todos los pacientes. En el grupo 2 con IGU por *Chlamydia trachomatis* de acuerdo al diagnóstico microbiológico, fue claro el predominio de casos con concentración escasa o moderada de cuerpos elementales de Clamidia que se observó en el 84,6% de los pacientes, mientras que la concentración mayor, de abundantes a muy abundantes cuerpos elementales, se encontró en el 45,5% de los casos del grupo 1 (Tabla XII, Figura 45).

De acuerdo al resultado del análisis estadístico, el número de cuerpos elementales observables en el semifino no presentó una diferencia significativa en la comparación hecha entre su porcentaje en el grupo IFD positivo (57,49%) y el del grupo IFD negativo (42,51%). ( $p=0,587$ ; Fisher). Tabla IXb.





### 5.3.2.3.2 Adheridos a Restos Celulares

En el 55% de los pacientes y en ninguno de los casos del grupo control ( $p=0,013$ ;  $\chi^2$  de Pearson), los cuerpos elementales se presentaron adheridos a la superficie de restos citoplásmicos: (Figura 44) en el 33,8% en concentración escasa y en el 16,3% en cantidad moderada. Esta observación se dio principalmente en un mayor número de casos y en un grado mayor del rasgo en los grupos 4 y 3 (Tabla XII; Figura 46).

De los 44 casos en los que se observaron cuerpos elementales adheridos a la superficie de los restos celulares, el 47,42% quedó incluido en el grupo IFD positivo y el resto en el grupo IFD negativo, resultando ésta diferencia porcentual estadísticamente no significativa ( $p=0,587$ ; Fisher).

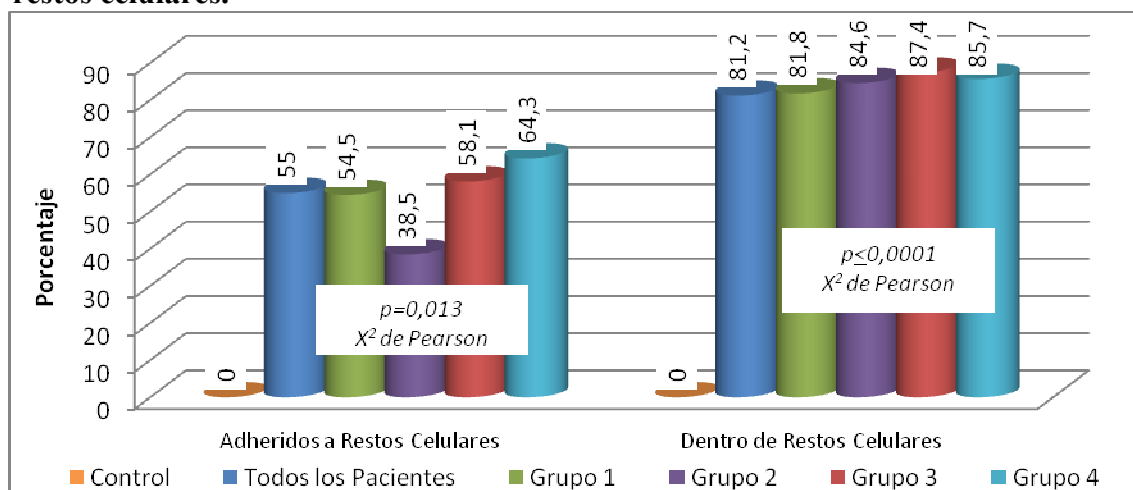
### 5.3.2.3.3 En el Interior de Restos Celulares

Un porcentaje comparativamente mayor de casos (81,2%) presentó cuerpos elementales ubicados en el interior de los restos citoplásmicos, aunque en cantidad escasa en poco más de la mitad de los casos (52,5%), moderada en el 17,5%, abundante en el 8,8% y muy abundante en el 2,5%. Esta localización de los cuerpos elementales por grupos de pacientes de acuerdo a diagnóstico bacteriológico fue: 81,8% para el grupo 1, 84,6% para el grupo 2, 87,4% para el grupo 3 y 85,7% para el grupo 4. El grupo de pacientes con IGU, mostró un mayor porcentaje de cuerpos elementales de *Clamidia* en el interior de

restos citoplásmicos ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson) con respecto al grupo control. (Tabla XII; Figura 46).

En el análisis comparativo por grupos, de acuerdo al diagnóstico por IFD en el semifino, para la característica presencia de cuerpos elementales en el citoplasma de restos celulares, no fue estadísticamente significativo ( $p=0,576$ ; Fisher). Tabla IXb.

#### Presencia de cuerpos Elementales de Chlamydia adheridos y en el interior de los restos celulares.



**Figura 46.** Porcentaje de pacientes con bacterias de morfología compatible con *Chlamydia*, adheridas y dentro de los restos celulares presentes en el líquido seminal de de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

#### 5.3.2.3.4 Adheridos a Células Epiteliales

La observación de cuerpos elementales adheridos a las células epiteliales (Figura 44) en los pacientes estuvo presente en el 40% y totalmente ausente en los casos del grupo control ( $p=0,102$ ;  $\chi^2$  de Pearson), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Ésta característica citológica estuvo presente en concentración escasa a moderada en la mayoría de los casos (37,5%) y fue más importante para el grupo con IGU por otros gérmenes que no fueron *Chlamydia trachomatis* o *Mycoplasma spp.* (Tabla XII).

En el análisis por grupos de acuerdo al diagnóstico por IFD, 56,25% de los casos con cuerpos elementales adheridos a las células epiteliales correspondieron al diagnóstico IFD positivo, mientras que 43,75% fueron IFD negativo, sin que ésta diferencia porcentual fuera significativa ( $p=0,444$ ; Fisher). Tabla IXb.

### 5.3.2.3.5 En el Citoplasma de Células Epiteliales

En mayor porcentaje de pacientes: 58,7%, que en el grupo control: 0%, ( $p=0,056$ ;  $\chi^2$  de Pearson) los cuerpos elementales de Clamidia se apreciaron dentro del citoplasma de las células epiteliales (Figura 44), siendo escasa su cantidad en el 33,8%, moderada en el 17,5% y abundante o muy abundante en el 7,6%. Esta localización de los cuerpos elementales por grupos de pacientes de acuerdo a diagnóstico bacteriológico fue: 63,6% para el grupo 1, 61,5% para el grupo 2, 51,6% para el grupo 3 y 64,3% para el grupo 4 (Tabla XII).

De acuerdo al resultado del análisis estadístico, el número de cuerpos elementales incluidos en el citoplasma de las células epiteliales observables en el semifino, no presentó una diferencia significativa en la comparación hecha entre su porcentaje en el grupo IFD positivo: 63,82% y el del grupo IFD negativo: 36,17%. ( $p=0,192$ ; Fisher). Tabla IXb.

### 5.3.2.3.6 Adheridos y en el Citoplasma de Leucocitos

La presencia de cuerpos elementales, adheridos o en el interior del citoplasma de leucocitos, fue un hallazgo infrecuente, ya que se observó en un número reducido de pacientes (6,2% y 7,5% respectivamente) y en grado leve. Sólo cabe destacar que la mayor frecuencia de ambos se apreció en el grupo 3, correspondiente a IGU por *Mycoplasma spp*, de acuerdo a diagnóstico microbiológico (Tabla XII, Figura 44).

De los 6 casos en los que se observó la presencia de cuerpos elementales en el citoplasma de los leucocitos, dos pertenecieron al grupo IFD positivo y 4 al grupo IFD negativos sin que esta diferencia numérica fuera significativa ( $p=0,192$ ; Fisher). Tabla IXb.

### 5.3.2.3.7 Adheridos a Macrófagos

Con mayor frecuencia que en el grupo control, ( $p=0,009$ ;  $\chi^2$  de Pearson) se observaron cuerpos elementales de Clamidia adheridos a macrófagos (en el 51,2% de los pacientes) o dentro de su citoplasma: 78,7% ( $p\leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson) (Figura 44). El 51,3% de los pacientes presentaron los cuerpos elementales adheridos al citoplasma de macrófagos en cantidad escasa o moderada. El mayor porcentaje de pacientes positivos para este rasgo perteneció al grupo 1 de IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp*. (63,6% de los casos), seguido del 57,2% de los pacientes del grupo de IGU por otros gérmenes (Tabla XII, Figura 47).



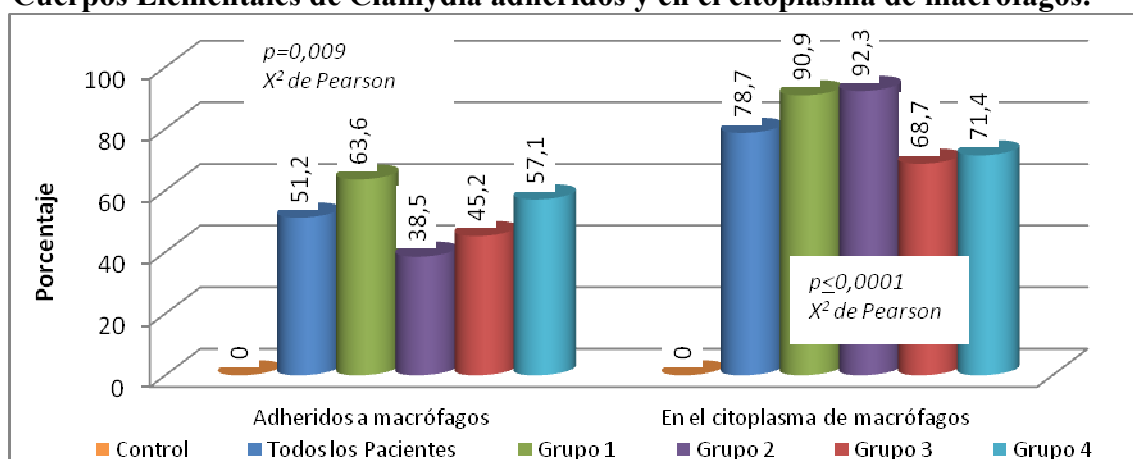
La comparación hecha acerca de la presencia de cuerpos elementales adheridos a macrófagos, entre el grupo IFD positivo (60,97% de los casos) y IFD negativo (30,03% de los casos), resultó no significativa estadísticamente ( $p=0,426$ ; Fisher).

### 5.3.2.3.8 En el Citoplasma de Macrófagos

En los pacientes con IGU, el hallazgo de cuerpos elementales presentes en el citoplasma de macrófagos (Figura 44) fue considerado escaso en el 35%, moderado en el 28,8%, abundante en el 12,5% y muy abundante en el 2,5% de los casos. Esta localización de los cuerpos elementales por grupos de pacientes de acuerdo a diagnóstico bacteriológico fue: 90,9% para el grupo 1, 92,7% para el grupo 2, 68,7% para el grupo 3 y 81,4% para el grupo 4. Destaca, el grupo 1, en el que se observaron cuerpos elementales de *C. trachomatis* dentro del citoplasma de macrófagos en cantidad de moderada a muy abundante en el 59,5% de los casos (Tabla XII, Figura 47). La presencia de cuerpos elementales en el citoplasma de macrófagos resultó ser de mayor importancia para el grupo de pacientes frente al grupo control ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

De acuerdo al resultado del análisis estadístico, el número de cuerpos elementales incluidos en el citoplasma de los macrófagos observables en el semifino, se presentó una diferencia significativa en la comparación hecha entre su porcentaje en el grupo IFD positivo: 65,07% y el del grupo IFD negativo: 34,92. ( $p=0,027$ ; Fisher). Tabla IXb.

**Cuerpos Elementales de Chlamydia adheridos y en el citoplasma de macrófagos.**



**Figura 47.** Porcentaje pacientes con cuerpos elementales de *Chlamydia* adheridos y en el citoplasma de macrófagos observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

### 5.3.2.3.9 Asociados a *Detritus*

Los cuerpos elementales de *Clamidia* se vieron en el área de *detritus* celulares (Figura 44) en el 77,2% de los pacientes y no se observaron en el grupo control ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Su concentración fue predominantemente escasa o moderada (35 y 31,3% respectivamente) y en menor porcentaje de pacientes fue abundante y muy abundante (11,3%). Los grupos 1 y 4 fueron los que incluyeron el mayor número de pacientes con esta característica, correspondientes al 90,9%, en el primero y 88,6% en el segundo (Tabla XII).

En el análisis por grupos, de acuerdo al diagnóstico por IFD, 56,45% de los casos con cuerpos elementales en el área de *detritus*, correspondieron al diagnóstico IFD positivo, mientras que 43,54% fueron IFD negativo, sin que esta diferencia porcentual fuera significativa ( $p=0,310$ ; Fisher). Tabla IXb.

### 5.3.2.3.10 Adheridos a Espermatozoides

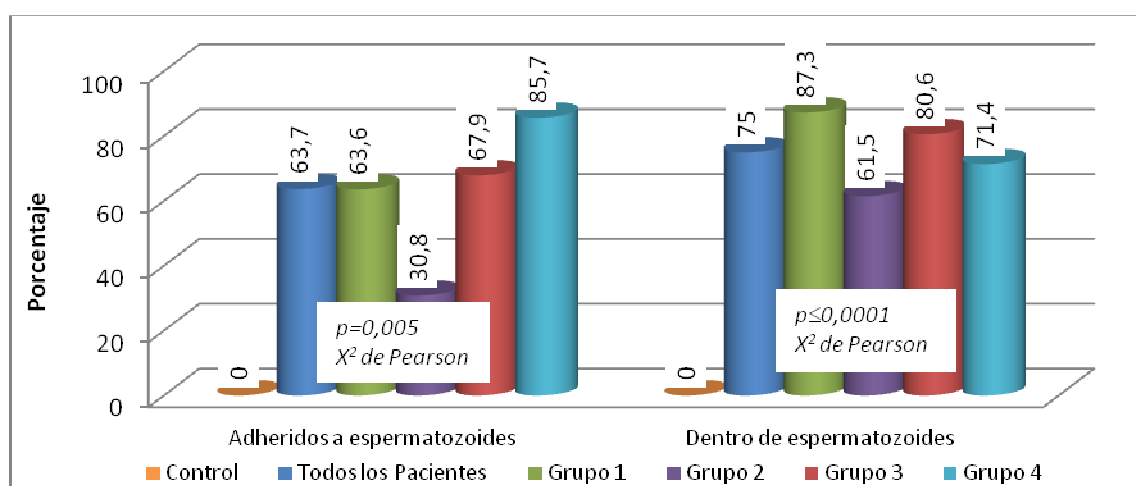
En el 63,7% de los pacientes se observaron cuerpos elementales de *Clamidia* adheridos a los espermatozoides, (Figura 44), 46,3% en cantidad escasa, 12,5% en cantidad moderada y 5,1% en cantidad abundante o muy abundante, estando presente en el 85,7% del grupo 4, en el 67,9% del grupo 3 y en el 63,6% del grupo 1. (Figura 48) Este parámetro fue, en su frecuencia de presentación, mayor en los pacientes que en los controles ( $p=0,005$ ;  $\chi^2$  de Pearson).

### 5.3.2.3.11 Dentro de Espermatozoides

El análisis de cortes semifinos del “*pellet*” seminal, registró en el grupo de pacientes, imágenes sugestivas de la presencia dentro del espermatozoide, de cuerpos elementales de *Clamidia* en un porcentaje de 75%, y fue superior al observado en el grupo control ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson) (Figura 44). En la mayor parte de los casos se consideró que este hallazgo estaba presente en escasa cantidad 41,3%, siendo moderada en el 27,5%, abundante y muy abundante en el 6,3%. Esta localización de los cuerpos elementales por grupos de pacientes de acuerdo a diagnóstico bacteriológico fue: 87,3% para el grupo 1, 61,5% para el grupo 2, 80,6% para el grupo 3 y 71,4% para el grupo 4. Tabla XII y Figura 48.

Respecto a la variable: presencia de cuerpos elementales dentro de los espermatozoides, 33 de los 60 casos (55%) en que se observó esta característica fueron diagnosticados como IFD positivos, mientras que los 27 casos restantes (45%) correspondieron al grupo IFD negativo. La diferencia de estos porcentajes no fue estadísticamente significativa ( $p=0,180$ ; Fisher). Tabla IXb.

### Cuerpos Elementales de Chlamydia



**Figura 48.** Porcentaje pacientes con cuerpos elementales de *Chlamydia* adheridos y dentro de los espermatozoides, observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

#### 5.3.2.3.12 Adheridos a Células Espermatogénicas

Los cuerpos elementales también se observaron adheridos a células espermatogénicas y este hallazgo estuvo presente en el 22,5% de los pacientes con IGU, aunque en grado escaso o leve para la mayoría de los casos en los que se observó (20%) y en cantidad moderada para el 2,5% de los pacientes. Al analizar la presentación por grupos, se encontró que la frecuencia de cuerpos elementales adheridos fue mayor en el grupo 3 de pacientes con IGU por *Mycoplasma spp.* (29%) y en el grupo 4 (28,6%), en el que sólo se identificaron gérmenes distintos a *Chlamydia trachomatis* o *Mycoplasma spp.* como gérmenes asociados a la IGU. Tabla XII y Figura 49.

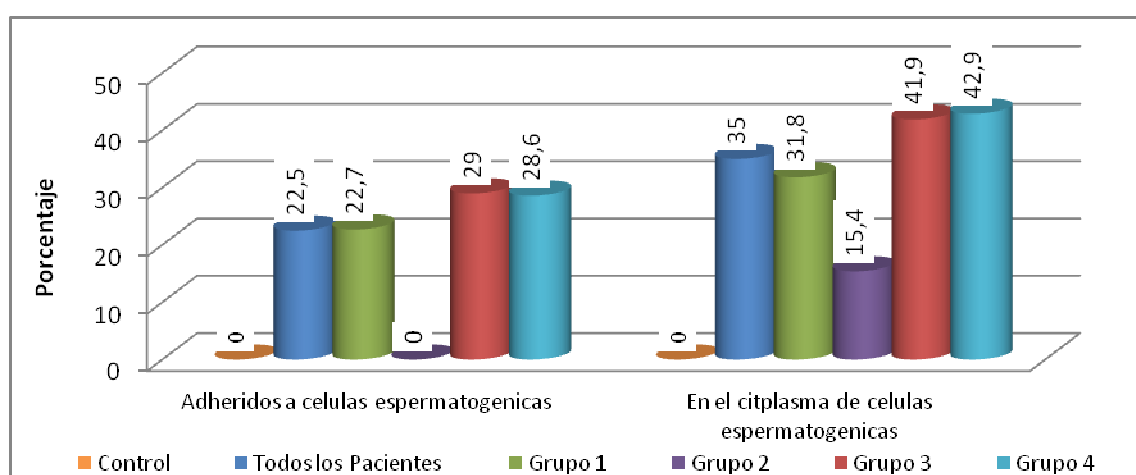
#### 5.3.2.3.13 En el Citoplasma de Células Espermatogénicas

El 35% de los pacientes con IGU presentaron cuerpos elementales en el citoplasma de células espermatogénicas: en cantidad escasa en el 26,3%, moderada en el 6,3%, abundante en el 1,3% y en un porcentaje igual, muy abundantes. Tanto la presencia de



cuerpos elementales adheridos a células espermatogénicas presentes en el líquido seminal, como cuerpos elementales dentro del citoplasma de las células espermatogénicas, fueron rasgos ausentes en las muestras de los casos del grupo control, sin que ésta diferencia fuera estadísticamente significativa. Tabla XII y Figura 49.

### Cuerpos Elementales de Chlamydia



**Figura 49.** Porcentaje pacientes con cuerpos elementales de *Chlamydia* adheridos y en el citoplasma de las células espermatogénicas, observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

#### 5.3.2.3.14 Análisis Estadístico de los Cuerpos Elementales por Diagnóstico Microbiológico

El análisis comparativo realizado entre los grupos de pacientes de acuerdo al diagnóstico microbiológico, con referencia a la presencia de cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis*, su concentración y localización con relación a los elementos citológicos del proceso inflamatorio realizado, arrojó resultados para los cuatro grupos, IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp*, IGU por *Chlamydia trachomatis*, IGU por *Mycoplasma spp*. e IGU por otros gérmenes, que fueron estadísticamente significativos, sólo para la variable número de cuerpo elementales presentes en el corte semifino ( $p \leq 0,05$ ; Fisher). Para el resto de las variables analizadas en éste capítulo no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla XII.** Presencia de cuerpos elementales de clamidia en el corte semifino del líquido seminal.

|  | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
|--|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Concentración de cuerpos elementales de clamidia</b>                        |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Escasos  | 0(0)                     | 29(36,3)                              | 3(13,6)                 | 8(61,5)                 | 13(41,9)                | 5(35,7)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 23(28,8)                              | 9(40,9)                 | 3(23,1)                 | 7(22,6)                 | 4(28,6)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 12(15)                                | 4(18,2)                 | 2(15,4)                 | 3(9,7)                  | 3(21,4)                 |
| Muy abundantes   | 0(0)                     | 15(18,8)                              | 6(27,3)                 | 0(0)                    | 7(22,6)                 | 2(14,3)                 |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia adheridos a restos celulares</b>            |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 36(45)                                | 10(45,5)                | 8(61,5)                 | 13(41,9)                | 5(35,7)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 27(33,8)                              | 5(22,7)                 | 4(30,8)                 | 12(38,7)                | 6(42,9)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 13(16,3)                              | 4(18,2)                 | 1(7,7)                  | 5(16,1)                 | 3(21,4)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 4(5)                                  | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia en el interior de restos celulares</b>      |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 15(18,8)                              | 4(18,2)                 | 2(15,4)                 | 7(22,6)                 | 2(14,3)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 42(52,5)                              | 9(40,9)                 | 9(69,2)                 | 14(45,2)                | 10(71,4)                |
| Moderados  | 0(0)                     | 14(17,5)                              | 5(22,7)                 | 2(15,4)                 | 5(16,1)                 | 2(14,3)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 7(8,8)                                | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 4(12,9)                 | 0(0)                    |
| Muy abundantes   | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia adheridos a células epiteliales</b>         |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 48(60)                                | 12(54,5)                | 11(84,6)                | 20(64,5)                | 5(35,7)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 22(27,5)                              | 7(31,8)                 | 2(15,4)                 | 6(19,4)                 | 7(50)                   |
| Moderados  | 0(0)                     | 8(10)                                 | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 2(14,3)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia en el citoplasma de células epiteliales</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 33(41,3)                              | 8(36,4)                 | 5(38,5)                 | 15(48,4)                | 5(35,7)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 27(33,8)                              | 7(31,8)                 | 5(38,5)                 | 8(25,8)                 | 7(50)                   |
| Moderados  | 0(0)                     | 14(17,5)                              | 7(31,8)                 | 1(7,7)                  | 5(16,1)                 | 1(7,1)                  |
| Abundantes   | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes   | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 0(0)                    | 2(15,4)                 | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia adheridos a leucocitos</b>                  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 75(93,8)                              | 22(100)                 | 12(92,3)                | 28(90,3)                | 13(92,9)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 5(6,3)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 3(9,7)                  | 1(7,1)                  |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia en el citoplasma de leucocitos</b>          |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 74(92,5)                              | 22(100)                 | 12(92,3)                | 27(87,1)                | 13(92,3)                |
| Escasos  | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Moderados  | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia adheridos a macrófagos</b>                  |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 39(48,8)                              | 8(36,4)                 | 8(61,5)                 | 17(54,8)                | 6(42,9)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 23(28,8)                              | 7(31,8)                 | 5(38,5)                 | 7(22,6)                 | 4(28,6)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 18(22,5)                              | 7(31,8)                 | 0(0)                    | 7(22,6)                 | 4(28,6)                 |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia en el citoplasma de macrófagos</b>          |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 17(21,3)                              | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 10(32,3)                | 4(28,6)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 28(35)                                | 8(36,4)                 | 9(69,2)                 | 8(25,8)                 | 3(21,4)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 23(28,8)                              | 9(40,9)                 | 3(23,1)                 | 5(16,1)                 | 6(42,9)                 |
| Abundante  | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 6(19,4)                 | 1(7,1)                  |
| Muy abundante  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia asociados a detritus celulares</b>          |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 18(22,5)                              | 2(9,1)                  | 5(38,5)                 | 8(25,8)                 | 3(21,4)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 28(35)                                | 10(45,5)                | 7(53,8)                 | 7(22,6)                 | 4(28,6)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 25(31,3)                              | 7(31,8)                 | 1(7,7)                  | 11(35,5)                | 6(42,9)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 8(10)                                 | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 4(12,9)                 | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia adheridos a espermatozoides</b>             |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente  | 10(100)                  | 29(36,3)                              | 8(36,4)                 | 9(69,2)                 | 10(32,2)                | 2(14,3)                 |
| Escasos  | 0(0)                     | 37(46,3)                              | 10(45,5)                | 4(30,8)                 | 14(45,2)                | 9(64,3)                 |
| Moderados  | 0(0)                     | 10(12,5)                              | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 4(12,9)                 | 3(21,4)                 |
| Abundantes   | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 3(9,7)                  | 0(0)                    |
| Muy abundantes   | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |

**Tabla XII (continuación).** Presencia de cuerpos elementales en el corte semifino del líquido seminal.

|   | Grupos                   |                                       |                         |                         |                         |                         |
|---|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|   | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80<br>n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Cuerpos elementales de clamidia dentro de los espermatozoides</b>    |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 20(25)                                | 5(22,7)                 | 5(38,5)                 | 6(19,4)                 | 4(28,6)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 33(41,3)                              | 12(54,5)                | 4(30,8)                 | 13(41,9)                | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 22(27,5)                              | 2(9,1)                  | 4(30,8)                 | 11(35,5)                | 5(35,7)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 3(3,8)                                | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos elementales adheridos a células espermatogénicas</b>         |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 62(77,5)                              | 17(77,3)                | 13(100)                 | 22(71)                  | 10(71,4)                |
| Escasos   | 0(0)                     | 16(20)                                | 5(22,7)                 | 0(0)                    | 7(22,6)                 | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 2(2,5)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos elementales en el citoplasma de células espermatogénicas</b> |                          |                                       |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 52(65)                                | 15(68,2)                | 11(84,6)                | 18(58,1)                | 8(57,1)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 21(26,3)                              | 7(31,8)                 | 1(7,7)                  | 9(29)                   | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 5(6,3)                                | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 2(14,3)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 1(1,3)                                | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |

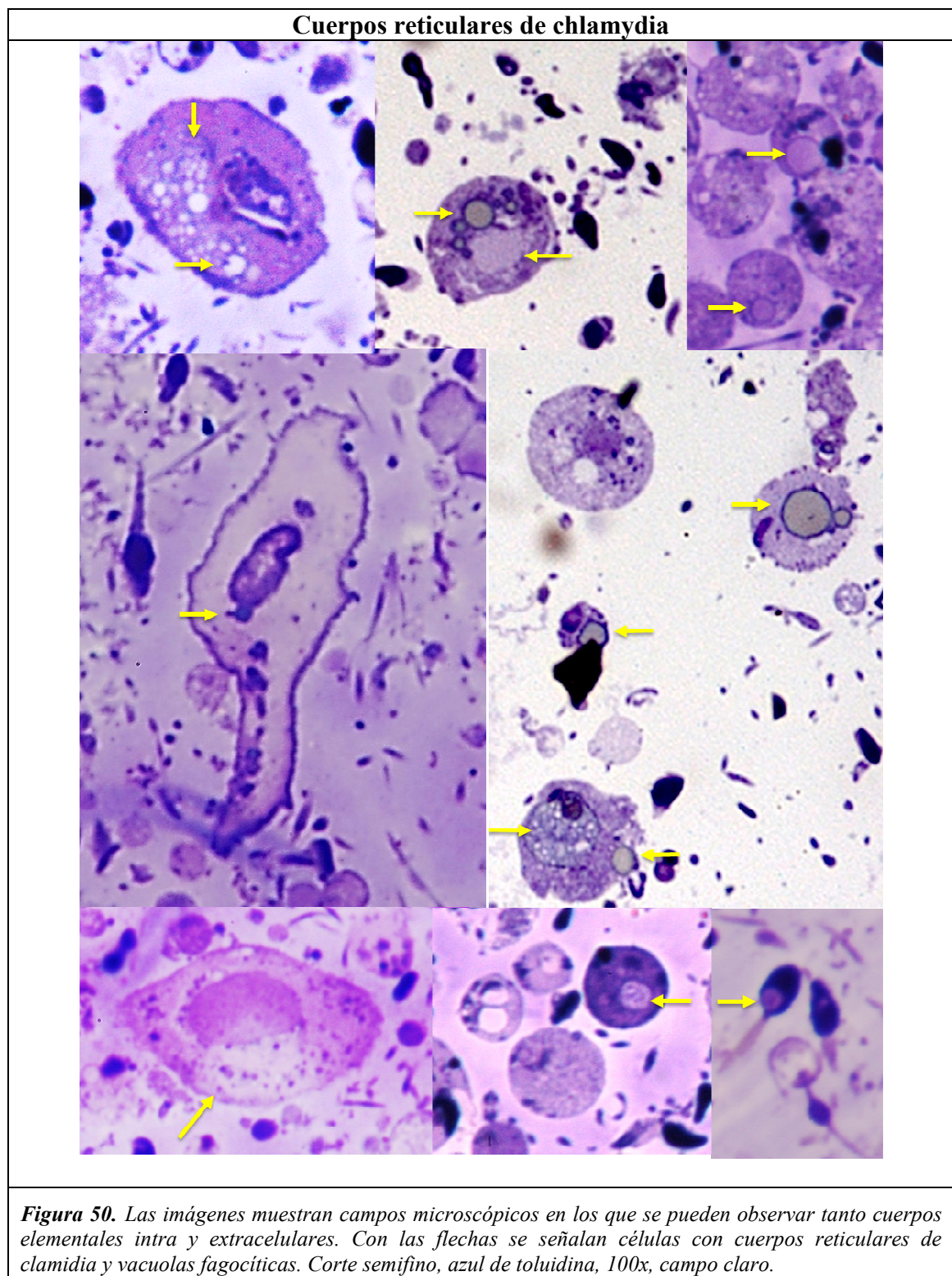
#### 5.3.2.4 Cuerpos Reticulares de *Chlamydia Trachomatis*

El examen del corte semifino permitió detectar la presencia de estructuras de morfología compatible con las descripciones citológicas clásicas de los cuerpos reticulares: corpúsculos de forma oval o esférica, de tamaño variable entre 1 y 3 micras, de bordes bien definidos y conteniendo múltiples vesículas, en cuyo interior con frecuencia se observaron cuerpos basófilos esféricos de 0,2 a 0,3 micras de diámetro. La localización de estas estructuras fue en ocasiones yuxtannuclear o cerca de la membrana plasmática. En ocasiones, estos cuerpos tuvieron la apariencia de una sola vesícula o vacuola no multiloculada (Figura 50).

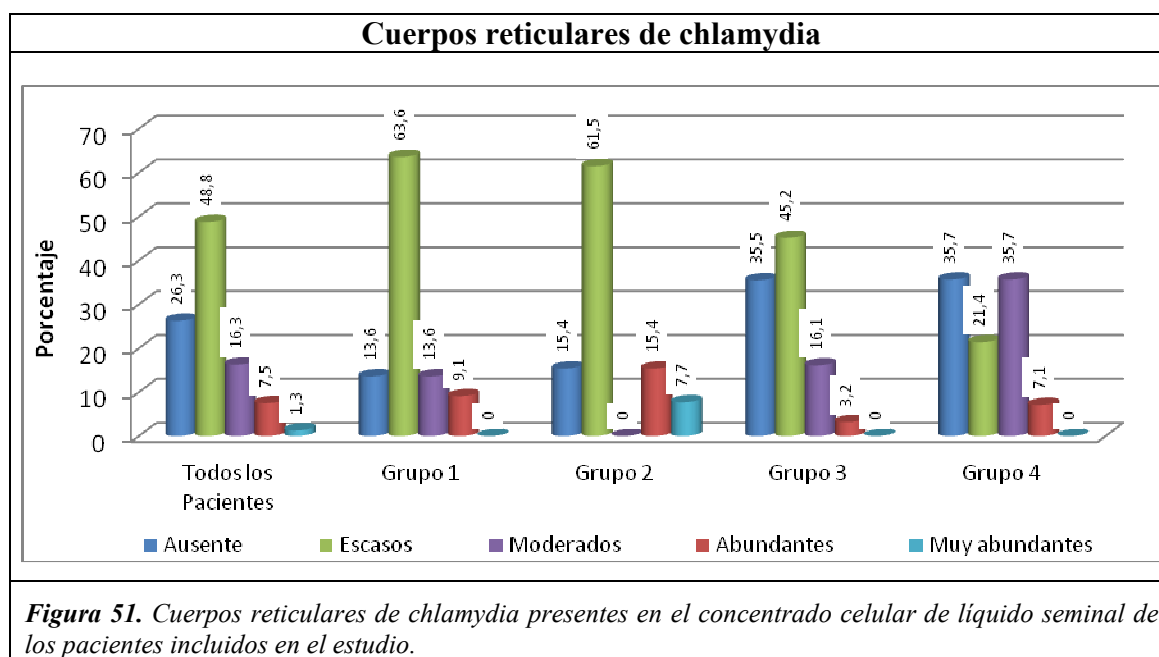
##### 5.3.2.4.1 Concentración

Estructuras de este tipo estuvieron presentes en el 73,7% de los casos de pacientes y no se observaron en los casos del grupo control, siendo ésta una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0,0001$ ;  $\chi^2$  de Pearson). En el 48,8% de los pacientes se presentaron en concentración escasa, en el 16,3% en concentración moderada y en el 78,8% fueron muy abundantes o muy abundantes. Al observar la distribución por grupos, los cuerpos reticulares de *Chlamydia* se encontraron en el 86,4% de los pacientes del grupo 1 (*Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.*) 84,6% de los casos del grupo 2 (sólo

Clamidia), 64,5% de los casos del grupo 3 (sólo Mycoplasma) y 64,3% de los casos del grupo 4 (otros gérmenes). Tabla XIII; Figura 51.



Los resultados del análisis de la frecuencia de presentación del número de cuerpos reticulares en el corte semifino de acuerdo al diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* por IFD, indicaron que el 62,71% de los casos con éste rasgo pertenecían al grupo IFD positivo, mientras que el 37,28 % quedó incluido en el grupo IFD negativo. Las no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,171$ ; Fisher). Tabla IXb.



#### 5.3.2.4.2 En el Citoplasma de los Restos Celulares

Las imágenes con cuerpos reticulares incluidos en los restos citoplásmicos estuvieron presentes en el 42,5%, considerándose escasos en el 31,3%, moderados en el 6,3%, y abundantes a muy abundantes en el 5,1%. La mitad de los pacientes del grupo 1, que corresponde al diagnóstico de IGU por Clamidia y Mycoplasma, el 61,5% de los casos del grupo 2, el 32,3% de los casos del grupo 3 y el 35,7% de los casos del grupo 4, presentaron cuerpos reticulares incluidos en los restos citoplásmicos. La presencia de cuerpos reticulares incluidos en los restos citoplásmicos fue mayor en el grupo de pacientes que en el grupo control pero la diferencia del porcentaje de casos positivos para esta característica morfológica entre esos grupos, no fue estadísticamente significativa ( $p=0,145$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Tabla XIII y Figura 50.

De los 34 casos en los que se evidenció la presencia de cuerpo elementales en el citoplasma de las células redondas, 61,76% pertenecieron al grupo IFD positivo y 38,23%

al grupo IFD negativos sin que ésta diferencia numérica fuera significativa ( $p=0,406$ ; Fisher). Tabla IXb.

#### 5.3.2.4.3 En el Citoplasma de Células Epiteliales

La localización de cuerpos reticulares en el citoplasma de las células epiteliales se registró en el 16,2% de los pacientes y no se observó en ninguno de los casos del grupo control, sin que ésta diferencia llegara a ser significativa ( $p=0,863$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Se consideró escasa su concentración en el 6,3%, moderada en el 5%, abundante en el 3,8% y muy abundante en el 1,3%. Tabla XIII y Figura 50.

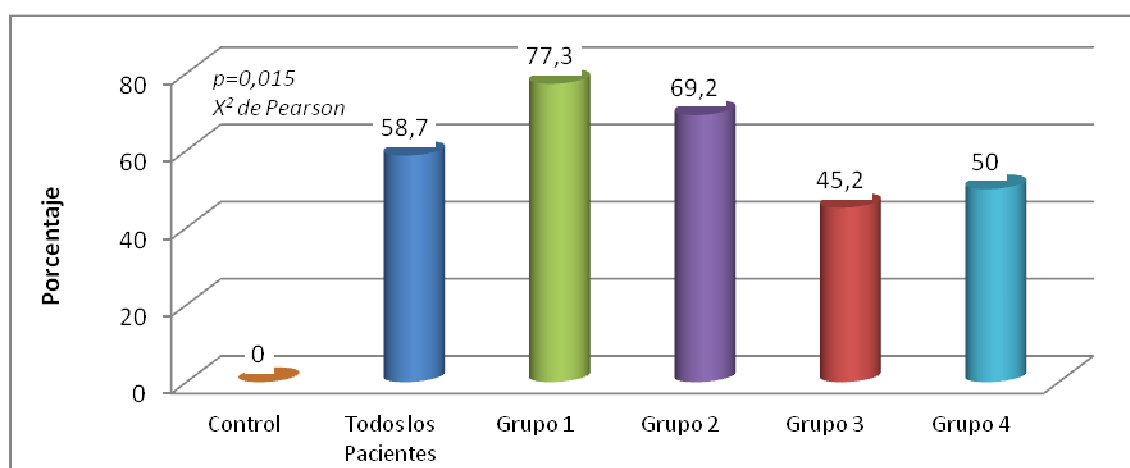
En el análisis por grupos de acuerdo al diagnóstico por IFD, 69,23% de los casos con cuerpos elementales en el citoplasma de las células epiteliales, correspondieron al diagnóstico IFD positivo, mientras que 30,76% fueron IFD negativo, sin que ésta diferencia porcentual fuera significativa ( $p=0,302$ ; Fisher). Tabla IXb.

#### 5.3.2.4.4 En el Citoplasma de Macrófagos

Con respecto a la presentación de cuerpos reticulares asociados a las células de inflamación, en ningún caso del grupo control se observaron cuerpos reticulares de Clamidia en el citoplasma de los macrófagos, los cuales estuvieron presentes en el 58,7% del grupo de pacientes ( $p=0,015$ ;  $\chi^2$  de Pearson), en los cuales, el 41,3% en cantidad escasa, el 10% en cantidad moderada y el 7,6% en cantidad abundante o muy abundante. Al observar la distribución por grupos, los cuerpos reticulares de Clamidia se encontraron en el 77,3% de los pacientes del grupo 1 (*Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.*), en el 69,2% de los casos del grupo 2 (solo Clamidia), 45,2% de los casos del grupo 3 (solo Mycoplasma) y 50% de los casos del grupo 4 (otros gérmenes). Tabla XIII, Figura 50 y 52.

Respecto a la variable: presencia de cuerpos elementales dentro de los espermatozoides, 33 de los 47 casos (61,6%), en que se observó esta característica fueron diagnosticados como IFD positivos, mientras que los 18 casos restantes (38,29%) correspondieron al grupo IFD negativo. La diferencia de estos porcentajes no fue estadísticamente significativa ( $p=0,341$ ; Fisher). Tabla IXb.

### Cuerpos reticulares de chlamydia

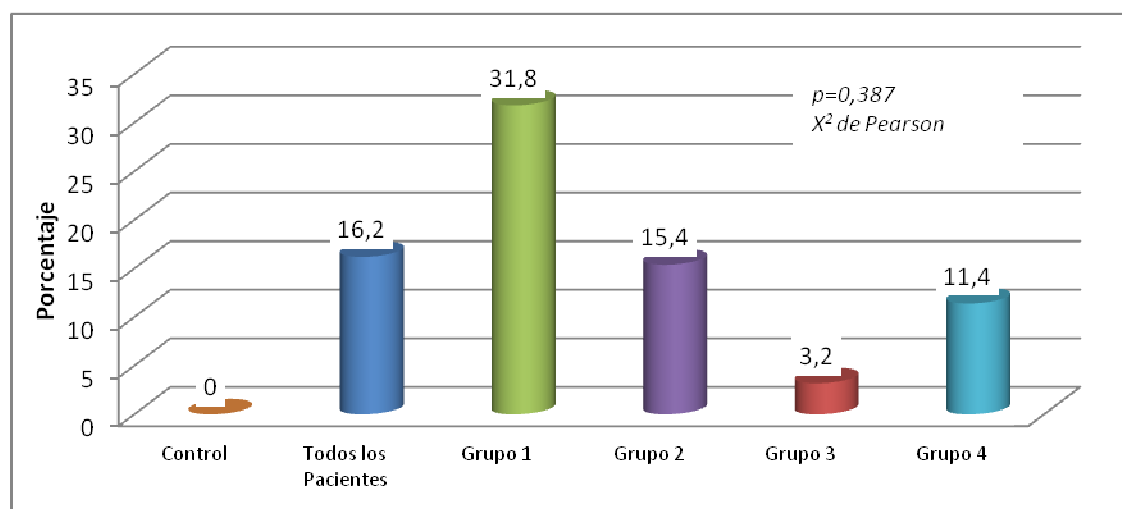


**Figura 52.** Porcentaje pacientes con cuerpos reticulares de *Chlamydia* presentes en el citoplasma de macrófagos, observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.

#### 5.3.2.4.5 Asociados a *Detritus*

La observación de cuerpos reticulares localizados en las áreas de *detritus* (Figura 50) se observó en 13 pacientes, correspondientes al 16,2% del total de casos, calificándose este rasgo como escaso o leve en 10 casos y moderado en 3 casos. La mayor proporción de casos positivos para este rasgo se encontraron en el grupo 1 con 31,8%. No se observó diferencia estadísticamente significativa para esta observación entre el grupo control y el grupo de pacientes ( $p=0,387$ ;  $\chi^2$  de Pearson). Tabla XIII y Figura 53.

### Cuerpos reticulares de chlamydia asociados a *detritus* celulares.



**Figura 53.** Porcentaje pacientes con cuerpos reticulares de *Chlamydia* asociados a *detritus* celulares, observados en el líquido seminal de los pacientes infértiles incluidos en el estudio.



### 5.3.2.4.6 En el Citoplasma de Células Espermatogénicas

Al investigar la presencia de cuerpos reticulares asociados a células germinales se encontraron imágenes que sugirieron su presencia en la cabeza o pieza media del espermatozoide en 3 casos del grupo con IGU. Sólo en dos casos de pacientes, se vieron estructuras del tipo de los cuerpos reticulares en el citoplasma de células espermatozoides. Tabla XIII y Figura 50.

| <b>Tabla XIII. Presencia de cuerpos reticulares de clamidia en el corte semifino del líquido seminal.</b> |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
|---|--------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|   | <b>Grupos</b>            |                                    |                         |                         |                         |                         |
|   | Control<br>n= 10<br>n(%) | Total de<br>pacientes<br>n=80 n(%) | Grupo 1<br>n=22<br>n(%) | Grupo 2<br>n=13<br>n(%) | Grupo 3<br>n=31<br>n(%) | Grupo 4<br>n=14<br>n(%) |
| <b>Concentración de cuerpos reticulares de clamidia</b>   |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 21(26,3)                           | 3(13,6)                 | 2(15,4)                 | 11(35,5)                | 5(35,7)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 39(48,8)                           | 14(36,6)                | 8(61,5)                 | 14(45,2)                | 3(21,4)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 13(16,3)                           | 3(13,6)                 | 0(0)                    | 5(16,1)                 | 5(35,7)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 6(7,5)                             | 2(9,1)                  | 2(15,4)                 | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 1(1,3)                             | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos reticulares de clamidia en el citoplasma de los restos celulares</b>                           |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 46(57,5)                           | 11(50)                  | 5(38,5)                 | 21(67,7)                | 9(64,3)                 |
| Escasos   | 0(0)                     | 25(31,3)                           | 8(36,4)                 | 6(46,2)                 | 7(22,6)                 | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 5(6,3)                             | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| Abundantes  | 0(0)                     | 3(3,8)                             | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 1(1,3)                             | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos reticulares de clamidia adheridos a células epiteliales</b>                                    |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 79(68,8)                           | 21(95,5)                | 13(100)                 | 13(100)                 | 14(100)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 1(1,3)                             | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos reticulares de clamidia en el citoplasma de células epiteliales</b>                            |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 67(83,8)                           | 18(81,8)                | 10(76,9)                | 26(83,9)                | 13(92,9)                |
| Escasos   | 0(0)                     | 5(6,3)                             | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 2(6,5)                  | 1(7,1)                  |
| Moderados   | 0(0)                     | 4(5)                               | 1(4,5)                  | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 0(0)                    |
| Abundantes  | 0(0)                     | 3(3,8)                             | 1(4,5)                  | 2(15,4)                 | 0(0)                    | 0(0)                    |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 1(1,3)                             | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(3,2)                  | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos reticulares de clamidia en el citoplasma de macrófagos</b>                                     |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 33(41,3)                           | 5(22,7)                 | 4(30,8)                 | 17(54,8)                | 7(50)                   |
| Escasos   | 0(0)                     | 33(41,3)                           | 12(54,5)                | 6(46,2)                 | 11(35,5)                | 4(28,6)                 |
| Moderados   | 0(0)                     | 8(10)                              | 3(13,6)                 | 1(7,7)                  | 2(6,5)                  | 2(14,3)                 |
| Abundantes  | 0(0)                     | 5(6,3)                             | 2(9,1)                  | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Muy abundantes  | 0(0)                     | 1(1,3)                             | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos reticulares de clamidia asociados a <i>detritus</i> celulares</b>                              |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 67(83,8)                           | 15(68,2)                | 11(84,6)                | 30(96,8)                | 11(78,6)                |
| Escasos   | 0(0)                     | 10(12,5)                           | 7(31,8)                 | 1(7,7)                  | 1(3,2)                  | 1(7,1)                  |
| Moderados   | 0(0)                     | 3(3,8)                             | 0(0)                    | 1(7,7)                  | 0(0)                    | 2(14,3)                 |
| <b>Cuerpos reticulares de clamidia dentro de los espermatozoides</b>                                      |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 77(96,3)                           | 20(90,9)                | 13(100)                 | 31(100)                 | 13(92,9)                |
| Escasos   | 0(0)                     | 1(1,3)                             | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |
| Moderados   | 0(0)                     | 2(2,5)                             | 2(9,1)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 0(0)                    |
| <b>Cuerpos reticulares de clamidia en el citoplasma de células espermatozoides</b>                        |                          |                                    |                         |                         |                         |                         |
| Ausente   | 10(100)                  | 78(97,5)                           | 21(95,5)                | 13(100)                 | 31(100)                 | 13(92,9)                |
| Escasos   | 0(0)                     | 2(2,5)                             | 1(4,5)                  | 0(0)                    | 0(0)                    | 1(7,1)                  |



#### 5.3.2.4.7 Análisis Estadístico de la Presencia de Cuerpos Reticulares por Diagnóstico Microbiológico

El análisis comparativo realizado entre los grupos de pacientes de acuerdo al diagnóstico microbiológico, respecto a la presencia de cuerpos reticulares, su concentración y localización con relación a los elementos citológicos del proceso inflamatorio realizado arrojó resultados que fueron estadísticamente significativos para las variables: número de cuerpos reticulares en el citoplasma de macrófagos y número de cuerpos reticulares asociados a *detritus* celulares ( $p \leq 0,05$ ; Fisher).

A ésta conclusión se llegó mediante la aplicación del test de Fisher. Para el resto de las variables analizadas en éste capítulo no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los datos analizados, número de casos, medias y el resultado de la prueba estadística pueden observarse en la Tabla IXb.

#### 5.4 ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD PARA LA IFD CONTRA CHLAMYDIA TRACHOMATIS EN EL CORTE SEMIFINO

El análisis estadístico del diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* en el corte semifino con azul de toluidina, evidenciado por la presencia de cuerpos elementales o cuerpos reticulares, se realizó mediante la prueba de sensibilidad y especificidad, utilizando como método de referencia, o estándar de oro, a la inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia trachomatis* aplicada al exudado uretral.

El resultado de ésta comparación determinó una sensibilidad de 96,97% (82,48-99,84) para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* en el corte semifino teñido con azul de toluidina. La especificidad de acuerdo a nuestro análisis fue 37,80% (29,47-46,87), con un valor predictivo positivo de 28,83% (20,82-38,32) y un valor predictivo negativo de 97,96% (87,76-99,81).

## **6. DISCUSIÓN**

Uno de los temas que se han considerado de interés a lo largo de las últimas tres décadas en la Andrología, es la caracterización de los llamados factores etiopatogénicos de la sub fertilidad de causa no conocida. Entre ellos la presencia de infecciones seminales que clínicamente no se manifiestan y permanecen ocultas por muchos años, han surgido como explicación del deterioro paulatino y gradual de la calidad espermática y de la capacidad fecundante del gameto masculino.

Las infecciones agudas y crónicas del tracto génito-urinario pueden contribuir sin duda y de forma importante en el origen de la infertilidad conyugal. Específicamente en el aparato reproductor masculino, un proceso infeccioso puede afectar adversamente la función de los espermatozoides, puede causar daño testicular o causar obstrucción del tracto genital (Keck *et al.*, 1998).

En el caso de los hombres subfértiles con IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasmas* genitales que incluimos en ésta tesis, el 79,3% presentaban alteraciones seminales compatibles con proceso IGU, en estudios previos pero solo 28,8% presentaban algún antecedente o rasgo clínico de IGU; esto sugiere la presencia de infecciones silentes que pudieran haber sido crónicas considerando el tiempo de infertilidad, de 4 años en promedio, de acuerdo a los datos recabados.

Las acciones deletéreas de las infecciones del tracto génito-urinario sobre la capacidad reproductiva de la pareja, en particular las causadas por gérmenes inespecíficos como lo son *Clamidia* y *Mycoplasma*, siguen siendo en la actualidad, susceptibles de discusión científica. Publicaciones clásicas acerca de infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, demostraron que estas se encuentran presentes en más del 70% de los casos de infertilidad conyugal (Kundsinn 1976). Sin embargo, la falta de incremento en las tasas de embarazos después del tratamiento de infecciones por *Clamidia* y *Mycoplasma*, ha generado controversia desde hace tiempo acerca de la importancia de éstos patógenos como causa de infertilidad (Rehewy *et al.*, 1978).

En nuestra experiencia el tratamiento exhaustivo de las IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* y su combinación con antioxidantes incrementa la tasa de éxito en el logro de embarazo y en nacimiento de niños sanos, lo cual se asocia al incremento en la calidad espermática y la disminución de la fragmentación de la cromatina espermática (Ramos-González, 2011; Gallegos *et al.*, 2008).

Las infecciones de la vía espermática y de las glándulas accesorias del aparato genital masculino son un hallazgo común en el hombre sub-fértil, no obstante la forma en que éstos procesos afectan la función de en cada una de las regiones anatómicas infectadas no se conoce claramente. Así pues, sin que los mecanismos que intervienen en las IGU estén perfectamente establecidos, las bacterias de la especie *Mycoplasma* se han relacionado directamente con alteraciones de la motilidad de los espermatozoides (Liu *et al.*, 2002). Los datos obtenidos de la presente tesis, aportan evidencia del deterioro del patrón de desplazamiento rectilíneo en los casos de pacientes con IGU, por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* que resultaron estadísticamente significativos, cuando se compararon con el grupo control y que pudiéramos relacionar directamente con la infección de espermatozoides, al haber observado en un porcentaje elevado de casos, la presencia de bacterias de morfología compatible con dichos gérmenes, adosados al flagelo y dentro del citoplasma de la pieza media del mismo.

En modelos animales, se ha comprobado la inducción de degeneración de células espermatógenicas y de las células de Sertoli a consecuencia de IGU (Audring *et al.*, 1989), y aunque para la especie humana existe una fuerte evidencia de que la infección genital puede participar en el desarrollo de patología seminal y testicular, aún permanecen oscuros numerosos aspectos clínicos y de investigación biomolecular. En todo caso la afectación testicular repercutiría en la concentración de espermatozoides, lo que en nuestro grupo de pacientes fue poco probable ya que la media de espermatozoides por mL de líquido seminal estuvo dentro de los rangos de normalidad. Es de notar, sin embargo que las cifras de espermatozoides presentes fueron menores en el grupo de pacientes en los que el diagnóstico bacteriológico demostró la presencia de gérmenes distintos de *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*

En el abordaje clínico convencional de las parejas con dificultad para procrear que padecen IGU, el diagnóstico de las lesiones implícitas se enfoca en primera instancia a descartar lesiones tubarias. No obstante en las últimas décadas un sinnúmero de publicaciones hacen referencia a que la infección genital afecta no sólo la función tubárica, sino que causa lesiones en diversos órganos del aparato genital masculino y femenino y que es una causa importante de esterilidad en el mundo (Vigil *et al.*, 2002; Mardh, 2002; Peipert, 2003; González *et al.*, 2004). Es por ello necesario, llegar a un diagnóstico microbiológico integral y completo en las parejas con esterilidad primaria y secundaria.

Bajo ésta consideración incluimos en ésta tesis el estudio clínico y microbiológico de las cónyuges de los pacientes seleccionados para cumplir con los objetivos propuestos.

La mayoría de las parejas de nuestros pacientes (90%) tenían antecedentes o sintomatología de infección genitourinaria al momento de éste estudio, y 74,4% habían recibido previamente tratamientos para IGU. Ambas situaciones fueron ligeramente más frecuentes en el grupo de IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*

Los protocolos clínicos y de laboratorio que se abocan al diagnóstico del factor infeccioso de la infertilidad y sub fertilidad, incluyen en general la prueba STORCH, para descartar la presencia de anticuerpos contra los gérmenes causales de la sífilis y toxoplasmosis así como el virus de la rubeóla, el citomegalovirus y el virus del herpes. Algunos otros gérmenes como el gonococo se consideran relevantes en éste abordaje médico desde hace varias décadas y solo hasta hace pocos años se ha señalado necesario investigar la presencia de *Chlamydia trachomatis* debido a su elevada frecuencia y la magnitud de los daños que puede causar en los órganos reproductores (Rodríguez *et al.*, 2001).

En los casos incluidos en ésta tesis, la presencia de éstas infecciones había generado obstrucción tubaria como secuela cicatricial en 17 pacientes, y aborto temprano como complicación obstétrica en el 65% de ellos. Se ha señalado reiteradamente que la importancia de las IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasmas* genitales, es mayor cuando se consideran las secuelas cicatriciales y las complicaciones obstétricas. Esto justifica una minuciosa investigación clínica y de laboratorio y su enfoque al diagnóstico preciso y tratamiento suficiente de los procesos de IGU, ocultos o poco manifiestos desde el punto de vista clínico, en los hombres con subfertilidad de etiología no conocida.

Una vez establecida la indicación de la evaluación de la infección en la infertilidad conyugal, el problema, es el de seleccionar el método diagnóstico más eficaz. En una primera consideración las pruebas moleculares pueden resultar a la vez que atractivas por su reconocida eficacia, inaccesibles para población general, por su naturaleza compleja y elevados costos. Se ha establecido que mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, pueden detectarse agentes infecciosos en menos de ocho horas y en general se considera que la técnica de PCR es más sensible que los cultivos, siendo posible además detectar DNA de gérmenes no viables. Sin embargo, en el caso de la infección seminal, existen casos falsos negativos para la prueba de PCR, que en el cultivo han sido positivos, posiblemente a causa de la presencia de inhibidores de la *Taq* polimerasa en ese tipo de

muestra biológica y la variabilidad en la secuenciación de nucleótidos (Stellrecht *et al.*, 2004).

Otras dificultades para el diagnóstico de las IGU, dependen de que en los cultivos microbiológicos el límite de sensibilidad sea determinado por número de gérmenes presentes en la alícuota inoculada en los medios de cultivo. Algunos métodos sencillos como el centrifugado de las muestras, en general, pueden incrementar la eficacia diagnóstica de los cultivos bacterianos del líquido seminal (Villanueva-Díaz *et al.*, 1999); pero aún así, el cultivo bacteriano para *Chlamydia trachomatis*, que requiere a su vez de cultivo de líneas celulares establecidas, y el cultivo de la especie *Mycoplasma*, que debe realizarse en medios enriquecidos, pueden ser inaccesibles para muchos laboratorios de seminología.

Buscando la forma de llegar a un diagnóstico molecular *in situ*, en material incluido en resina epóxica, susceptible de ser analizado por técnicas microscópicas de alta capacidad resolutive, como es el corte semifino, aplicamos la técnica de IFD con anticuerpos monoclonales contra la MOMP de *Chlamydia trachomatis*, en el concentrado seminal incluido en resina epóxica y ulteriormente desplastificado.

Los resultados confirmaron el 58,75 % de los casos en los que se visualizaron partículas bacterianas compatibles con la especie *Chlamydia trachomatis*, pero un número grande de partículas de morfología similar no presentó positividad a la reacción de inmunofluorescencia.

Algunas condiciones dependientes de las características de la técnica empleada, como lo es el grosor del corte semifino 0,25  $\mu\text{m}$  de grosor y el diámetro de las bacterias pudieron determinar que las partículas no se observaran en las secciones subsecuentes. La aplicación de soluciones cáusticas para la desplastificación pudo dañar los epítopes o señales moleculares que darían la reacción de inmunofluorescencia.

Cierta cantidad de partículas pudieran efectivamente no corresponder a *Chlamydia trachomatis*, ya que el proceso infeccioso en cuestión ocurre generalmente como una coinfección entre éste germen y una o varias especies de Micoplasmas genitales, cuya morfología pudiera ser insuficientemente específica para discriminar una de otra.

El análisis convencional del líquido seminal aporta evidencias de procesos infecciosos de la vía seminífera y las glándulas anexas, sobre todo los aspectos físico-químicos: volumen color, viscosidad, tiempo de licuefacción y pH. A diferencia del color

que se califica en forma subjetiva, el resto de esos parámetros son en todos los laboratorios, evaluados en forma precisa.

Se ha sugerido que la presencia de color amarillo del líquido seminal, pudiera estar relacionada no solamente a la ingesta de carotenos en la alimentación sino que también puede darse en consecuencia de los tratamientos antibióticos administrados, así como a la presencia de bacterias en el líquido seminal y leucocitos activos. En nuestro estudio se observó un predominio del color aperlado para el grupo control y aumento de la frecuencia del color amarillo en las muestras de los pacientes, más notorio en los pacientes con IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* que en el resto de los grupos.

Respecto al volumen de líquido seminal la WHO (2010) sugiere como normal, volúmenes menores de 1,5mL y superiores de 6mL. La hiperspermia (volúmenes mayores de 6 mL), que en nuestra casuística se presentó en 17 pacientes, sugiere infección de la vía seminífera y, en particular, de las vesículas seminales.

Por el contrario cuatro pacientes presentaron hipospermia o volumen seminal bajo (menor de 1,5mL). Una vez que se descarta deficiencia androgénica y la pérdida de fracciones del eyaculado durante la recolección del líquido seminal, el volumen seminal bajo pudiera relacionarse con patologías obstructivas de los conductos excretores a nivel del epidídimo y conducto deferente, como lo han señalado otros autores para la infección gonocócica y por *Chlamydia trachomatis* (Tapia y Rojas, 2003). La obstrucción ductal ocasiona también emisión de volumen seminal bajo que se asocia a baja concentración de fructosa y *alfa* glucosidasa y se acompaña de oligozoospermia severa o azoospermia, aunque el tamaño testicular y los niveles de gonadotrofinas séricas sean normales (Nagler, 2008).

Nosotros consideramos que otra explicación posible para la disminución del volumen seminal y en particular para nuestros pacientes, pudiera ser la atrofia e hipofunción de las vesículas seminales, afectadas crónicamente por la infección e inflamación, ya que aún sin haber determinado los niveles de *alfa* glucosidasa ni fructosa seminal, la concentración espermática no presentaba afectación mayor.

Otra condición que se ha referido en asociación con un proceso inflamatorio crónico de las glándulas anexas a la vía seminífera es la hiperviscosidad seminal, presente en el 26,3% de los pacientes de éste estudio y que por igual se ha descrito en casos de infección por *Ureaplasma urealyticum* y *Chlamydia trachomatis* (Wang *et al.*, 2006). En nuestra

opinión la hiperviscosidad seminal conduciría a dificultad para la emisión completa del eyaculado y por lo tanto con disminución del volumen del eyaculado.

Durante mucho tiempo se ha considerado que la viscosidad seminal anormal, vista en los pacientes infértiles puede ser debida a infección; la hiperviscosidad seminal corresponde, según algunos autores, a la hipofunción de las vesículas seminales que se presenta con leucocitospermia y puede ser secundaria a procesos inflamatorios post-infecciosos (WHO, 1992; Gonzales *et al.*, 1992).

Gonzales *et al.*, en 1999, realizaron un estudio en 42 hombres infértiles sin encontrar diferencias significativas en relación a la presencia de hiperviscosidad seminal y el porcentaje de espermatozoides móviles; sin embargo encontró astenozoospermia en el 63,6% de las muestras con hiperviscosidad y 35,7% en las muestras con viscosidad normal. Es así que la hiperviscosidad seminal ha sido relacionada con alteración de la movilidad de los espermatozoides.

Como parte de nuestros resultados observamos que la motilidad espermática del grupo de pacientes y controles mostró diferencias significativas para los patrones de desplazamiento curvilíneo y rectilíneo principalmente y para la suma de estos valores. Aún sin relacionarse con aumento de la consistencia o hiperviscosidad del líquido seminal, la calidad del movimiento de los espermatozoides se relacionó claramente con la infección.

Otro mecanismo que podría explicar la disminución de la motilidad espermática sería la presencia de las caspasas en el líquido seminal. Estas proteínas se generan a consecuencia de la presencia de ROS, son importantes en la regulación de la apoptosis, que implica fragmentación del ADN espermático, y lleva a depleción de la celularidad en el epitelio seminífero. Entre las condiciones clínicas relacionadas con la producción de caspasas se encuentran además de la infección, la torsión testicular, el varicocele y la infertilidad inmunológica (Said *et al.*, 2004). En el grupo de pacientes que estudiamos para ésta tesis, se encontraron 24 casos con diagnóstico de varicocele, 10 de ellos habían sido sometidos a extirpación quirúrgica del mismo, de los cuales 4 presentaban recidiva del varicocele.

El metabolismo energético a partir de la glucosa podría ser una de las vías afectadas cuando los espermatozoides se encuentran infectados, ya fuera que tuvieran bacterias que se adhieren a la superficie de la membrana o bien que estuvieran incluidas en su citoplasma modificando las rutas metabólicas convencionales. El metabolismo energético a partir de



glucosa es requerido para la activación del axonema e incluye la producción y regeneración de ATP y de intermediarios como el NADPH, necesarios para las vías de señalización interna, que conducen a la fosforilación de las proteínas flagelares para la generación del movimiento. El ingreso de glucosa al citosol se da a través de transportadores como el *GLUT3* en la pieza intermedia o el *GLUT8* en la región acrosomal, o por reservas endógenas en forma de glicógeno. La glucosa es transformada en glucosa-6-fosfato por la enzima hexoquinasa, para generar ATP o NADPH, por una de tres vías, dependiendo del dominio del flagelo: la glicolítica, la vía pentosa fosfato y la vía mitocondrial de la fosforilación oxidativa; ésta última fuente principal de ATP (Olivera *et al.*, 2006). Además esta vía es afectada con el ingreso de  $H_2O_2$ , producto del metabolismo de los Micoplasmas, el cual en concentraciones elevadas produce elevación de ROS.

Mientras que está bien documentado que la Clamidia produce prostatitis crónica, ésta no parece ser causa de patología obstructiva de la vía espermática, a menos que haya inflamación y cicatrización a nivel de los conductos eyaculadores; la obstrucción del conducto eyaculador no es una causa común de infertilidad, aunque la infección está presente en el 22 a 50% de estos pacientes (Dohle, 2003).

En décadas anteriores, la infección glandular en el tracto reproductivo ha ofrecido particular dificultad diagnóstica debido a la vaguedad de los síntomas y la importancia de patógenos de diagnóstico problemático como *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum*. La importancia de las infecciones de las glándulas anexas al tracto reproductor masculino en relación con la infertilidad del varón ha sido reiterativamente cuestionada (Badalyan *et al.*, 2003). No obstante, el empleo de la ultrasonografía transrectal ha proporcionado evidencia objetiva de inflamación de las vesículas seminales asintomática coincidente con epididimitis aguda, identificándose como germen causal a *Chlamydia trachomatis* (Furuya *et al.*, 2004).

En los pacientes con IGU, la observación en los cortes semifinos de cuerpos amiláceos infectados por bacterias de tipo clamidial sugieren disfunción de la próstata y vesículas seminales (Gallegos, 2005); de acuerdo a los datos obtenidos de la presente tesis, un apreciable número de pacientes estudiados presentaron también cambios en el volumen, viscosidad, pH del líquido seminal, que aunados al hallazgo de cuerpos amiláceos sugieren infección de las glándulas productoras del semen.

En el caso de las próstato-vesiculitis, algunos investigadores han reconocido las limitaciones diagnósticas que los cultivos bacterianos tienen, debidas principalmente al

contenido de sustancias inhibitorias del crecimiento bacteriano del semen y de la orina, que impiden el crecimiento de microorganismos, a menos que se encuentren en grandes cantidades, como ocurre en procesos infecciosos agudos. Los numerosos ciclos de tratamiento antimicrobiano a los que frecuentemente se han sometido los pacientes, son otra causa de la ineficiencia diagnóstica de los cultivos bacterianos en la prostatitis; por ello, nuevos métodos de PCR se están aplicando recientemente a biopsias de próstata para identificación de DNA bacteriano, incluidos el de *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium* y de genes de resistencia a antibióticos, como la tetraciclina.

En todo caso el desbalance entre la producción de secreción por parte de las vesículas seminales con las secreciones prostáticas ya fuera por hipersecreción ante la inflamación aguda o la secreción baja de la inflamación crónica, afectará el pH seminal.

El pH registrado en las muestras seminales de pacientes y controles no mostró diferencias significativas, sin embargo se registraron elevaciones del pH en el 72,5% de los hombres subfértiles. El pH del semen varía normalmente en un rango muy estrecho (7,2-8,0), pocos son los trastornos capaces de alterarlo pero se ha sugerido que un pH elevado (>8) puede considerarse un signo de infección seminal si se asocia a otros síntomas y signos de sospecha (WHO, 2010). En nuestro estudio los valores máximos obtenidos en la medición del pH corresponden a los del grupo de pacientes, pudiendo sugerir que la presencia de bacterias incrementa ligeramente éste valor. En ésta tesis reportamos elevaciones notorias del pH seminal de 8,4 a 8,8, en asociación con la infección seminal por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* concordando con los reportes de otros autores (Wang *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2008).

Hasta hoy los reportes de la literatura no aclaran la relación entre la disminución de la concentración de espermatozoides y la infección seminal. Podría suponerse que mientras la infección no afecte la función testicular ni ocasione bloqueo parcial o completo de los ductos excretores la cifra de espermatozoides debe mantenerse. Cuando el proceso infeccioso se localiza en el testículo, el proceso inflamatorio crónico severo puede conducir a la atrofia testicular, con azoospermia u oligospermia del tipo secretoria. En nuestro estudio se observó que la concentración de espermatozoides por mL fue menor en el grupo de pacientes con IGU que en el grupo control, pero no se encontraron diferencias en los pacientes que se relacionaran con el diagnóstico microbiológico.

Estudios realizados recientemente por nuestro grupo han demostrado que tras el tratamiento de la IGU se produce un incremento en el número de espermatozoides

seminales (Ramos-González, 2011), quedando por establecer si esto fue debido a la disminución de procesos inflamatorios semi-obstructivos de la vía seminífera o a recuperación de la función testicular.

Habría que considerar que en el desarrollo de orquiepididimitis, si bien en la fase inicial de la infección por *Chlamydia trachomatis*, los gérmenes se localizan en la superficie de las células infectadas, las clamidias tienen capacidad de invadir el tejido conectivo sub epitelial en las fases más avanzadas de la infección. La llegada de células de inflamación: polimorfonucleares, histiocitos y células plasmáticas, con la ulterior fibrosis intersticial, daría origen en primera instancia a la orquiepididimitis subaguda y ulteriormente a su estadio crónico que pudiera cursar con fases de reagudización. Estas lesiones pueden llevar a la formación de quistes epididimarios e hidrocele y llegar a la obstrucción total del conducto epididimario con la consecuente oligospermia obstructiva.

Las publicaciones existentes respecto a la motilidad espermática y la infección por *Chlamydia trachomatis* presentan conclusiones contradictorias. Un gran número de estudios sugieren que no existen modificaciones en los parámetros espermáticos cuando se presenta infección por *Chlamydia trachomatis* (Zdrowska *et al.*, 2006; Gdoura *et al.*, 2007; Eggert-Krouse *et al.*, 2003). Por otra parte, otros autores han encontrado alteraciones en la motilidad espermática cuando existe infección por *Chlamydia trachomatis* (Jakiel *et al.*, 2004). Un estudio realizado en 627 pacientes de los cuales 136 presentaba infección por *Chlamydia trachomatis*, mostraba una disminución de la calidad seminal y espermática con respecto al control. Estos cambios eran referentes a la presencia de espermatozoides normales que se redujeron en un 14,4% al volumen seminal que fue 6,4% menor en los hombres con la infección; la concentración de espermatozoides fue 8,3% más baja y la motilidad fue 7,8% menor que en el grupo control (Veznik *et al.*, 2004).

Varios estudios han documentado una asociación entre *Ureaplasma urealyticum* y la infertilidad. Gnärpe y Friberg en 1972, observaron una prevalencia de 85% en cultivos de hombres infértiles, muy diferente de la encontrada en hombres fértiles (27%). Fowlkes *et al.* (1975), evaluaron 625 hombres con infertilidad de etiología desconocida y encontraron una correlación entre el cultivo positivo para *Ureaplasma urealyticum*, con una disminución de la motilidad e incremento de defectos morfológicos del espermatozoide, asociándose frecuentemente a una disminución de su capacidad fecundante (Fowlkes *et al.*, 1975).

Nuestro grupo ha observado una elevada incidencia de coinfecciones por Clamidias y Micoplasmas presentes en el líquido seminal de hombres subfértiles en la región noreste de México, y en base a ello hemos podido llevar a cabo estudios para definir su asociación con las alteraciones de los parámetros seminales, encontrando afectación en la mayoría de los marcadores de función espermática y en la calidad seminal. Además hemos demostrado que estas infecciones afectan la integridad del ADN del espermatozoide humano hasta 3,2 veces más que en los pacientes sanos sin infección (Gallegos *et al.*, 2008).

La evaluación de una pareja infértil implica una multitud de parámetros a considerar, en la mayoría de los casos, los mecanismos etiopatogénicos de la infertilidad masculina están ligados a una o más alteraciones en los parámetros espermáticos; un estudio realizado por Menkveld *et al.* (2011), demostró diferencias significativas en la motilidad, concentración y morfología espermática al evaluar 107 pacientes fértiles y 103 infértiles, encontrando 40% y 21% de espermatozoides de forma normal, respectivamente.

Aunque se ha considerado que las características estándar de los espermatozoides son pobres predictores del éxito de la reproducción asistida, los defectos estructurales detectados mediante una rigurosa evaluación de la morfología de los espermatozoides y la integridad estructural de la cromatina de los espermatozoides son de importancia decisiva para la fertilización, sospechándose también que este hecho tenga singular importancia en el desarrollo embrionario temprano. La aplicación de la técnica de TUNEL detectó un porcentaje de fragmentación de la cromatina de los espermatozoides de más del 10%, que afectó al porcentaje de fertilización, independientemente de la técnica de fertilización empleada: IVF o ICSI (Benchabib *et al.*, 2003).

Aunque en nuestro grupo fueron las inseminaciones intrauterinas (223 procedimientos) el tratamiento infructuoso de fertilidad, que habían previamente recibido dos tercios de las parejas estudiadas para ésta tesis, se registró también como antecedente, la realización de 26 procedimientos de reproducción asistida que fueron fallidos, entre ellos 9 casos de ICSI. Cabe la posibilidad de relacionar éstos hechos con la existencia de una infección seminal no diagnosticada o insuficientemente tratada y con las alteraciones morfológicas de los espermatozoides, particularmente las que implicaron daño nuclear y cromatínico, observadas en los cortes semifinos y que se correlacionaron significativamente con el diagnóstico de IGU.

Alteraciones específicas de la morfología de los espermatozoides han podido ser asociadas con un alto porcentaje de anormalidades de la cromatina de los espermatozoides,

determinadas por técnicas como la hibridación *in situ* fluorescente, en pacientes infértiles atendidos en clínicas de infertilidad mediante técnicas de fertilización *in vitro* e ICSI (Lewis-Jones, 2003).

En la actualidad, medida de acuerdo con criterios estrictos, la morfología de los espermatozoides sigue siendo el parámetro de mayor valor informativo para diferenciar entre los varones fértiles e infértiles. En nuestro estudio los pacientes sub-fértiles con IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* mostraron niveles elevados de teratozoospermia y ésta, comparada con los niveles de los controles, mostró diferencias estadísticamente significativas.

Diferentes estudios indican que la morfología es el mejor predictor de la fertilidad de entre todos los parámetros evaluados del seminograma, y que el porcentaje de espermatozoides con morfología normal es una característica esencial de la capacidad de fecundación *in vivo* (Liu *et al.*, 2010). Los criterios estrictos de evaluación de la morfología de los espermatozoides se relacionan a factores como el tiempo transcurrido para el logro de embarazo y las tasas de embarazo *in vivo* e *in vitro* y han ayudado a definir la apariencia normal del gameto masculino y su potencial fertilizante proponiendo que pueden ser utilizados como factor pronóstico de la fertilidad (Liu *et al.*, 2010; Menkveld *et al.*, 2011).

En ésta última publicación se estableció un valor porcentual que define a los hombres fértiles e infértiles y este debe encontrarse entre 0 y 30%, aunque se sabe que pocos son los casos que exceden el 25% de espermatozoides de forma normal. No obstante, hemos encontrado trabajos que presentan la existencia de casos de fertilidad aun con morfología alterada entre 3 y 5% en procedimientos de fertilización *in vitro* (Coetzee *et al.*, 1998), inseminación intrauterina (Van Waart *et al.*, 2001) así como fertilidad *in vivo* (Van der Merwe *et al.*, 2005).

Algunos de los cambios en la morfología de los espermatozoides que se observaron con frecuencia en éste estudio del líquido seminal de los pacientes infértiles con IGU, como son la vacuolación nuclear y la descompactación de la cromatina, pudieran ser secundarios a la fragmentación de la cromatina, un hallazgo característico de la apoptosis; la fagocitosis de espermatozoides que fue observada en el 85% de los pacientes de este estudio, pudiera resultar del reconocimiento de espermatozoides apoptóticos o con defectos morfológicos. La coincidencia de cambios autolíticos en espermatozoides que

contenían bacterias a nivel de la pieza media, podrían estar en relación con incremento de la concentración de cisteín-proteasas y la inducción de apoptosis.

Una de las primeras condiciones para la interpretación de los cambios citomorfológicos en cualquier tipo de preparación es la conservación intacta de las características propias del espécimen normal o patológico. En éste estudio, para impedir la introducción de lesiones artefactuales en los espermatozoides, la centrifugación a la que se sometió el líquido seminal, como paso inicial en el procesamiento de inclusión en resina epóxica, fue intencionadamente baja (1000 rpm por 10 minutos), comparada con la que previamente fue recomendada para incrementar la eficacia de los cultivos bacterianos del líquidos seminal (Villanueva-Díaz *et al.*, 1999). Sin embargo, el procedimiento permite la concentración de todo el contenido celular y particulado de la muestra y la observación de bacterias en los cortes finos y semifinos, que en su dilución original pudieron haber escapado al límite de sensibilidad de las pruebas microbiológicas, particularmente en el caso del cultivo en medios selectivos para Mycoplasmas.

A diferencia de lo que sucede en los casos de IGU severas y agudas, en los que las pruebas inmunológicas tienen un acreditado valor diagnóstico (Schiefer, 1998; Witkin, 2002), las infecciones leves o limitadas a las superficies epiteliales pueden quedar fuera de la capacidad diagnóstica de estas pruebas. Es bien conocido que las pruebas serológicas permiten evaluar la respuesta inmunológica generada por las infecciones bacterianas, pero esta respuesta se produce sólo en aquellos casos que cursan con exposición de antígenos bacterianos a las células del sistema inmune; contrariamente, las infecciones superficiales y las que cursan con ausencia de actuación del sistema inmune, no son susceptibles de ser diagnosticadas por estos métodos serológicos. Además, aún en los casos en que se detectara la presencia de anticuerpos anti-clamidia en suero, no permitiría, detectar la localización precisa de la infección, lo que es particularmente importante en aquéllas parejas que presentan infección subclínica.

Utilizando una prueba directa realizada en el exfoliado uretral, en el grupo de pacientes seleccionados para ésta tesis detectamos 43,75 % de hombres infértiles con IGU que fueron positivos para la prueba de *Chlamydia trachomatis*, usando anticuerpos monoclonales fluorescentes; no obstante, el estudio en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina del líquido seminal, detectó la presencia de partículas bacterianas compatibles por su morfología con los cuerpos elementales de Clamidia, en el 96.5% de los pacientes infértiles. Este resultado debe ser estimado bajo la consideración de que en el 79,3% de los

pacientes estudiados se registró el antecedente de alteraciones seminales por lo menos un año antes, así que el padecimiento y sus causas podrían considerarse crónicas; además, 28,8% de los pacientes tenían al momento del estudio algún síntoma relacionado con IGU o habían tenido algún cuadro clínico de IGU previo, y en el 95% de las cónyuges en las que se pudo practicar evaluación microbiológica del exudado cérvico-vaginal, se detectó al momento de este estudio la presencia de *Chlamydia trachomatis* o *Mycoplasma sp.*

Las co-infecciones y las infecciones por múltiples gérmenes en el caso de las ETS, suceden con cierta frecuencia. En el caso particular de *Chlamydia trachomatis* y de dos especies de *Mycoplasma* (*M. hominis* y *U. urealyticum*) se han encontrado en asociación con virus del herpes, *Treponema pallidum* y virus de papiloma humano (Zvulunov *et al.*, 2000; Luostarinen *et al.*, 2004), así como con el virus de la inmunodeficiencia humana (Obasi *et al.*, 2001; Kouri *et al.*, 2002). Esta situación multicausal, en la que participan concomitantemente varios gérmenes patógenos, hace aún más compleja y costosa la posibilidad de efectuar un diagnóstico microbiológico o molecular exhaustivo de los gérmenes presentes en el semen o del exudado vaginal de esos pacientes con infecciones mixtas.

En la presente serie, el 27,5% de los pacientes evaluados presentaban dos gérmenes asociados a la IGU, entre los cuales se encontraban *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*. En el resto de los casos, las pruebas microbiológicas aplicadas detectaron sólo una de las bacterias investigadas, incluyendo el 16,25%, que fueron positivas solo para *Chlamydia trachomatis* detectada por IFD del exfoliado uretral y 38,25 en los que se solo se aisló *Ureaplasma urealyticum* y/o alguna de las tres especies de *Mycoplasmas* genitales investigados: *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma fermentans*. De éste modo solo 17,15% de los pacientes sub-fértiles con IGU, incluidos en éste estudio, carecerían teóricamente de *Mycoplasmas* y *Clamidias* en el líquido seminal.

A pesar de que en los estudios citomorfológicos a menudo no se pueden precisar las especies o sub-especies bacterianas, sí se puede realizar una revisión mas exhaustiva del espécimen y una descripción completa de los prototipos bacterianos que contenga la muestra. En ésta tesis el análisis del corte semifino permitió detectar la presencia de bacterias que por su dimensión y morfología fueron reportadas como pertenecientes a la especie *Mycoplasma* en el 98,7% de los casos de los pacientes subfértiles con IGU y en el mismo porcentaje se reporto la presencia de partículas compatibles con *Clamidia*. Sin

embargo la IFD aplicada al corte semifino confirmó la presencia de partículas bacterianas fluorescentes en 47 casos (58,5%).

Consideramos que en las 33 muestras seminales negativas por IFD en el semifino para *Chlamydia trachomatis*, tendríamos que plantearnos si la desplastificación incompleta hubiera impedido la unión del anticuerpo contra el antígeno bacteriano o bien si la exposición a la acción abrasiva de los agentes desplastificantes hubiera dañado los epítopes. Una posibilidad más sería que los casos detectados por el examen del corte semifino teñido con azul de toluidina fueran falsos, procediendo el error de las diferencias morfológicas sutiles entre Clamidias y Mycoplasmas.

No obstante, la observación y análisis de la forma, tamaño y patrón de agregación de los gérmenes permite una aproximación diagnóstica, que justifica la realización de pruebas microbiológicas más específicas. Sin duda, datos referentes a la concentración bacteriana *in situ*, su patrón de colocalización, su interacción con las células propias del espécimen biológico analizado, incluyendo también las células de la respuesta inflamatoria, complementan el cuadro citológico y bacterioscópico y enriquecen la utilidad de éste tipo de estudios (Ramos-González y Gallegos, 2001; Gallegos *et al.*, 2002).

La importancia de la leucocitospermia en la patogénesis de la infertilidad ha sido motivo de controversia por muchos años, algunos estudios la han relacionado a baja calidad del semen, mientras que otros han fallado para demostrar esta asociación (Wolf, 1995). Sólo en estudios recientes se ha evaluado la presencia de defectos de la morfología de los espermatozoides en asociación con la leucocitospermia. Menkveld y Kruger, en 1998, determinaron la influencia de la IGU sobre la morfología del espermatozoide en 150 muestras seminales. Encontraron una correlación positiva entre los dos parámetros cuando la presencia de leucocitos se evaluó por estudio citológico, pero no se pudo confirmar esa asociación cuando la presencia de leucocitos se determinó por la reacción de mieloperoxidasa. Aziz *et al.*, (2004), estudiaron 56 hombres infértiles y 13 donadores de semen sanos, evaluando la concentración de granulocitos mediante la tinción con mieloperoxidasa, y la morfología de los espermatozoides a 1000 aumentos y con aplicación de criterios morfológicos estrictos; estos autores determinaron que la leucocitospermia se encontró positivamente correlacionada con el porcentaje de espermatozoides con daño acrosomal, presencia de gota citoplásmica y defectos de la pieza media. De acuerdo a nuestras observaciones el análisis de la morfología espermática en hombres infértiles con IGU concuerdan con lo señalado por éstos autores, al demostrar la



presencia de elementos inflamatorios y bacterias coexistiendo con espermatozoides anormales, pero en nuestro estudio se ha precisado que es el enrollamiento del flagelo, la pieza media doblada y engrosada, y la disminución del área acrosomal, fueron las anomalías morfológicas más frecuentes; en nuestro estudio describimos además otros cambios en la citomorfología seminal concomitantes al proceso inflamatorio, como son el esfacelo de células epiteliales y células germinales inmaduras infectadas.

Inicialmente se consideró que el daño estructural de los espermatozoides se originaría durante la espermatogénesis. Álvarez *et al.*, en el año 2002, sugería que la gota citoplásmica persistente pudiera ser interpretada como secundaria a una función defectuosa de la célula de Sertoli y desorganización de la espermiogénesis con la ulterior alteración en el proceso de maduración durante el tránsito del espermatozoide a nivel del epidídimo dañado.

En los años recientes diferentes hipótesis han sido propuestas acerca de una asociación entre la leucocitospermia y el daño en la estructura de los espermatozoides. Se ha demostrado por ejemplo, que la elevada incidencia de defectos del flagelo espermático está asociada con anormalidades cromosómicas de los espermatozoides (Lewis-Jones *et al.*, 2003), y se ha sugerido que el daño genético peroxidativo que acompaña a la leucocitospermia, puede conducir a un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides con cola defectuosa.

La leucocitospermia puede ser un marcador del proceso inflamatorio subclínico, en el que mediadores pro inflamatorios alteren la regulación de la espermiogénesis. Un segundo mecanismo potencial a través del cual la leucocitospermia induce daño espermático es la producción excesiva de ROS por leucocitos activados.

Se ha argumentado que el estrés oxidativo puede inducir alteraciones en la regulación de la espermatogénesis que culmina con la producción de espermatozoides de forma anormal. A nivel subcelular, se ha demostrado que los niveles excesivos de ROS están asociados con un incremento de alteraciones de la cromatina y daño del DNA espermático (Álvarez *et al.*, 2002; Gallegos *et al.*, 2008a).

Coincidentemente con ésta hipótesis, entre las alteraciones registradas más frecuentemente observadas en asociación a la IGU se encuentran espermatozoides con macronúcleos, cromatina descompactada, vacuolación nuclear, además del engrosamiento de la pieza media y pieza principal del flagelo (Gallegos, 2005). Estos cambios pudieran

estar relacionados con el daño oxidativo causado por ROS y con la presencia de bacterias dentro de los espermatozoides, intranucleares e intraflagelares, tal como hemos evidenciado en nuestros estudios de microscopía electrónica del líquido seminal (Gallegos, 2008b).

El examen que realizamos en cortes semifinos del centrifugado seminal aporta evidencias de manera altamente significativa, acerca del proceso de infección seminal en varones con fertilidad disminuida. Así, en el grupo de pacientes infértiles, a diferencia del grupo control, la presencia de bacterias fue característica en todos los casos y se acompañó de células inflamatorias, *detritus* celulares, células epiteliales exfoliadas y células germinales inmaduras y con diversos grados de autólisis.

La relación de la leucocitospermia con la infección seminal está avalada por el hecho de que las células inflamatorias presentan cambios característicos de incremento de una actividad fagocitaria, con marcada vacuolación del citoplasma, emisión de pseudópodos, e incorporación intracitoplásmica de bacterias, restos celulares y espermatozoides. Las observaciones que hemos hecho en éste estudio y en estudios previos (Gallegos *et al.*, 2008b; Gallegos, 2005) con microscopio electrónico de partículas bacterianas no capsuladas, de 100 a 300 nm de diámetro, adheridas a la membrana plasmática de las células presentes en el líquido seminal e incluidas en vacuolas endocíticas es similar a las imágenes presentadas por Chang *et al.*, (1985) en un cultivo de células de leucemia infectado con *Ureaplasma urealyticum*.

El patrón de alteraciones en la estructura del espermatozoide parece estar directamente relacionado con la infección. La presencia de vacuolas intranucleares, una de las peculiaridades morfológicas más evidentes, parece ser consecuente con la adhesión de bacterias a la superficie de las células inflamatorias y espermatozoides y su ulterior incorporación al núcleo; estas vacuolas, con frecuencia, incluyen material particulado, restos membranosos y también a las propias bacterias (Gallegos *et al.*, 2005; Gallegos *et al.*, 2008b).

Los resultados de ésta tesis coinciden con algunas publicaciones previas de otros autores centradas en estudios de microscopía electrónica que evalúan la relación entre la presencia de Mycoplasma y la infección seminal (Fowlkes *et al.*, 1975; Busolo *et al.*, 1984), ya que se ha constatado la adherencia y la incorporación del Mycoplasma en la pieza media del espermatozoide.

Recientemente se ha demostrado que las infecciones seminales causadas por *Clamidia* tienen un efecto nocivo para la función de los espermatozoides, particularmente sobre la reacción acrosomal (Jungwirth *et al.*, 2003). De hecho la disminución del área acrosomal, como hemos señalado fue en el grupo de pacientes incluidos en ésta tesis una de los defectos espermáticos mas frecuentes.

La respuesta inflamatoria ante la infección por *Chlamydia trachomatis* induce la activación de macrófagos, la liberación de citocinas pro-inflamatorias y ROS, que se encuentran significativamente elevados, cuando se comparan con los datos obtenidos en los controles sin infección por *Chlamydia trachomatis*. En el momento actual existen evidencias suficientes acerca de que los niveles elevados de ROS afectan la reacción acrosomal, estando los espermatozoides normalmente protegidos por el líquido seminal del efecto dañino de ROS (Aitken, 1997; Agarwal y Saleh, 2002).

La inmunopatogénesis de las infecciones causadas por la especie *Clamidia* ha resultado ser muy compleja, ya que ésta bacteria estimula la respuesta inmune humoral y la mediada por células. Deben considerarse, en este sentido la liberación de citocinas, las reacciones de hipersensibilidad tardía, con los subsecuentes cambios inflamatorios y la presencia y el significado funcional de las proteínas de shock térmico (Egger-Kruse *et al.*, 2003). De otra parte, es bien conocido que el tracto reproductor masculino se encuentra aislado del sistema inmune; por ello, la detección de anticuerpos circulantes no es en algunos pacientes un buen indicador de trastornos de la inmunidad en el tracto reproductor.

La presencia de anticuerpos séricos anti-*Clamidia* en mujeres se ha relacionado con la presencia de anticuerpos, principalmente IgA, en el líquido seminal; pero estos hallazgos no siempre se correlaciona con la presencia en el varón de anticuerpos anti-*Clamidia* séricos. La presencia de anticuerpos anti-*Clamidia* en semen se ha relacionado con el desarrollo de autoinmunidad hacia los espermatozoides. En la infección persistente por *Chlamydia trachomatis*, se producen niveles elevados de una proteína de shock térmico de 60-kDa y se ha relacionado también con la presencia de anticuerpos anti-*Clamidia* en el semen y de autoinmunidad hacia el espermatozoide (Witkin, 2002).

Vigil *et al.*, (2002b) confirmaron en un grupo de hombres infértiles con infección por *Chlamydia trachomatis*, y mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión, la presencia de formas reticulares y elementales de la bacteria, asociadas a los espermatozoides, de acuerdo con lo previamente descrito (Wolner-Hansen y Mardh, 1984; Villegas *et al.*, 1991; Erben, 1993). Los cuerpos elementales han sido descritos como

pequeñas partículas adheridas a toda la superficie del espermatozoide, tanto en la cabeza como al flagelo. Al igual que en nuestro estudio, los cuerpos elementales han sido vistos incluso dentro del núcleo del espermatozoide (Vigil *et al.*, 2002b). Los espermatozoides infectados por *Chlamydia trachomatis* constituyen así un vehículo o agente de transmisión activo que disemina la enfermedad al tracto genital femenino y al propio tracto genital masculino.

En nuestro estudio, la presencia de los cuerpos elementales (basófilos, esféricos de 200 a 300 nm de diámetro), fue evidente en células epiteliales exfoliadas, pero también se observó en células espermatogénicas inmaduras; además, la localización de cuerpos elementales íntimamente asociados con los espermatozoides puso también en evidencia la importancia etiológica de éste germen en la generación de la teratozoospermia que acompaña a la infección seminal.

Cuerpos elementales de Clamidia, de morfología similar de la que informamos en la presente tesis en base a las características morfológicas, fueron observados hace casi dos décadas, en células epiteliales descamadas del cérvix uterino (De Borges y Carvallo, 1987). Así mismo, en un estudio de siete pacientes con infertilidad se diagnosticó *Chlamydia trachomatis* mediante el análisis de tres muestras endocervicales, y también en material obtenido de una biopsia epididimaria y de una muestra de líquido seminal (Villegas-Castrejón *et al.*, 1989 y Villegas *et al.*, 1991).

De otra parte, Erbengi (1993), consiguió detectar *Chlamydia trachomatis* en cuatro pacientes infértiles que tuvieron abortos y muerte perinatal, y en los que las pruebas microbiológicas realizadas -cultivos selectivos y métodos de inmunoensayo para Clamidia y también para Mycoplasma- fueron negativas; además, se pudo precisar el ciclo vital completo de *Chlamydia trachomatis* en el líquido seminal (Erbengi, 1993).

Se ha demostrado que espermatozoides maduros de pacientes que se atienden por infertilidad tienen daño del DNA, variación en el contenido de lípidos de la membrana, cambios en la estructura de la cromatina, en la morfología y motilidad de los espermatozoides. Ollero *et al.*, (2001) estudiaron las variaciones en la producción de ROS, y su relación con el contenido y estructura de la cromatina y con la composición lipídica de los distintas fracciones obtenidas por centrifugación por gradientes de densidad de espermatozoides de semen de pacientes infértiles.

Estos autores encontraron que el daño del DNA y la producción de ROS fue mayor en espermatozoides inmaduros con retención de la gota citoplásmica y morfología anormal de la cabeza, que en espermatozoides maduros. Igualmente el contenido de ácido docohexanoico, principal responsable de la fluidez de la membrana del espermatozoide y blanco de la peroxidación por ROS, así como el contenido de esteroles, fue mayor en espermatozoides inmaduros y menor en espermatozoides maduros. La proporción relativa de la producción de ROS contra la producción de espermatozoides inmaduros estuvo directamente relacionada con el daño del DNA en espermatozoides maduros, e inversamente correlacionada con la recuperación de espermatozoides móviles. No hubo una correlación entre la producción de daño al DNA y la morfología de los espermatozoides maduros (Ollero *et al.*, 2001). Los autores interpretaron estos resultados proponiendo que los niveles altos de ROS y la producción de DNA dañado que se observa en espermatozoides inmaduros resulta de desarreglos en la regulación de la espermiogénesis; además, el daño en el DNA de espermatozoides maduros puede ser el resultado del daño oxidativo por ROS, producidos por los espermatozoides inmaduros durante la migración espermática desde los túbulos seminíferos al epidídimo. Este estudio no investiga la presencia de gérmenes o de inflamación de la vía seminífera que pudiera estar presente a nivel epididimario o testicular, bien determinando el desprendimiento de espermatozoides inmaduros desde los túbulos seminíferos infectados, o bien generando una deficiente eliminación de la gota citoplásmica en el epidídimo inflamado. Nuestras observaciones acerca de la presencia de espermatozoides con gota citoplásmica agrandada han coincidido con la demostración de *Mycoplasma* y *Chlamidia* infectando la pieza media y dentro del núcleo de los espermatozoides, así que ésta sería otra posible explicación para la asociación previamente publicada entre la producción de ROS y la presencia de alteraciones estructurales de la cromatina y de gota citoplásmica remanente (Ollero *et al.*, 2001).

La fragmentación del DNA, reconocida en los últimos años como una causa de infertilidad, ha sido estudiada por diversas técnicas. Fernández *et al.*, (2003) propusieron un método sencillo, basado en la incapacidad que tiene el espermatozoide con DNA fragmentado para producir el halo de dispersión de la cromatina, que se observa en el espermatozoide sin fragmentación del DNA, una vez que se induce químicamente la desnaturalización y remoción de las proteínas nucleares (Fernández *et al.*, 2003). Este método ha podido ser utilizado de rutina en algunos laboratorios de andrología como

complemento a la evaluación morfológica, lo que permitió relacionar ambos parámetros para establecer un pronóstico en reproducción asistida (Morales, 2007). Estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado una asociación entre la fragmentación del DNA con la patología infecciosa de la vía seminífera y en particular con gérmenes como clamidias y mycoplasmas, que pueden ser incorporados al núcleo del espermatozoide (Gallegos *et al.*, 2008).

Como antes se mencionó, asociadas a la dismorfia se han asociado un alto porcentaje de anomalías del complemento cromosómico de los espermatozoides, determinadas por hibridación fluorescente *in situ*, en pacientes infértiles atendidos en clínicas de fertilización *in vitro* e ICSI (Lewis-Jones, 2003). Espermatozoides con doble cabeza, multinucleados o con doble flagelo se identificaron en pacientes con disomía, trisomía y tetrasomía del cromosoma 18 y de los cromosomas sexuales. Estos hallazgos han alertado hacia el riesgo de herencia de cromosomas anormales a hijos logrados por técnicas de reproducción asistida y han permitido recomendar la valoración morfológica rigurosa de los espermatozoides, previa a la reproducción asistida. Sin embargo, los estudios citomorfológicos del semen llevados a cabo convencionalmente con microscopio de luz pueden ser insuficientes para la clara caracterización del patrón de teratozoospermia.

La teratozoospermia, asociada a una producción excesiva y muy heterogénea de espermatozoides dismórficos y a alteraciones combinadas de sus diferentes componentes, determina un deterioro de la capacidad fecundante del gameto masculina. Así, las anomalías de la cabeza del espermatozoide, que constituyen el hallazgo más frecuente en los pacientes teratozoospermicos, expresa diferentes alteraciones en la organización y función de la cromatina, de la teca perinuclear, del acrosoma o de la influencia del citoesqueleto en la modelación del núcleo. Con frecuencia se observan en la teratozoospermia severa defectos de la maduración y de la compactación de la cromatina, con hipoplasia del acrosoma; pero su incidencia fluctúa a lo largo de la evolución clínica, de modo que en algunos casos se ha asociado tanto a la infertilidad como al aborto (Chemes *et al.*, 1998; Zamboni, 1987).

De nuestros resultados en el grupo de pacientes infértiles se puede asociar la presencia de teratozoospermia secundaria a IGU con el antecedente de aborto único o recurrente, el cual fue referido por casi la tercera parte de las parejas evaluadas, habiéndose comprobado por ultrasonido vaginal, en el 60% de los casos, el diagnóstico de huevo muerto retenido o embarazo anembriónico. Queda por establecerse si, independientemente

del daño cromosómico de los espermatozoides infectados, el germen causal de la IGU pudiera por sí mismo ocasionar la suspensión del desarrollo embrionario.

Se ha detectado, un aumento estadísticamente significativo en la incidencia de infección por *Chlamydia trachomatis* en mujeres con aborto espontáneo (21%), en hombres cuyas cónyuges habían tenido aborto recurrente (59,4%) y en ambos cónyuges de parejas con aborto recurrente (68.7%). El examen de oocitos de hamster incubados con los espermatozoides infectados detectó la presencia de cuerpos elementales adheridos e incluidos en el citoplasma (Vigil *et al.*, 2002a). Estos autores han propuesto que la infección directa del cigoto o la respuesta inmune con producción de proteínas de shock pudieran ser los mecanismos patogénicos implícitos en la pérdida gestacional temprana. En la infección por *Chlamydia trachomatis* se encuentran elevados los linfocitos Th1 y Th2 y los niveles séricos de citocinas autoinflamatorias, incluidas las IL-12 e IL-18. En mujeres con inflamación, se ha demostrado obstrucción tubaria y adherencias tubo-ováricas severas por *Chlamydia trachomatis* ; en este sentido, se ha encontrado que una proteína de shock térmico de 60 kDa, denominada CHSP60, estimula y regula la respuesta de células inflamatorias, induciendo la producción de interferón  $\gamma$  e IL-10 (Kinnunen *et al.*, 2003). La respuesta inmune celular mediada por linfocitos Th1 es necesaria para la inmunidad de protección contra una gran variedad de gérmenes intracelulares, incluyendo la Clamidia. Se ha sugerido que la IL-18 juega un importante papel en la inducción de inmunidad contra Clamidia, porque estimula el desarrollo de la IL-12, dependiente de los Th1, la cual, a su vez se encuentra en una estrecha relación con la CHSP60. La Clamidia induce la secreción de IL-18 por las células epiteliales infectadas, y esta secreción está regulada a nivel post-transcripcional por un mecanismo dependiente de caspasa-1, una cisteín-proteasa que es esencial en el paso de la pro-IL-18 a su forma madura (Lu *et al.*, 2000).

De otra parte, las caspasas son como hemos ya señalado, importantes en la regulación de la apoptosis en el epitelio seminífero y han sido implicadas en la patogénesis de en una variedad de alteraciones andrológicas, tales como la depleción de la espermatogénesis, los trastornos de la motilidad de los espermatozoides, los niveles aumentados de fragmentación del DNA espermático, la torsión testicular, el varicocele y la infertilidad inmunológica (Said *et al.*, 2004). La apoptosis está correlacionada positivamente con los niveles de ROS en el eyaculado completo, existiendo en hombres con infertilidad idiopática una correlación positiva entre el daño espermático por ROS y los niveles elevados de citocromo c y de las cisteín-proteasas CP9 y CP3, lo que indicaría

la presencia de apoptosis (Wang *et al.*, 2003). Mayor concentración de CP3 se ha encontrado en pacientes con motilidad disminuida de los espermatozoides, habiéndose localizado actividad de CP3 en la pieza media de espermatozoides con movimiento deficiente y en el núcleo de espermatozoides de DNA fragmentado. Todos estos datos sugieren que los mecanismos de apoptosis dependientes de caspasa pudieran tener relación con la formación de la gota citoplásmica, pero también con la regulación de funciones mitocondriales y nucleares (Said *et al.*, 2004). Es más, muy probablemente pudiera interrelacionarse el daño espermático provocado por ROS principalmente los generados por los granulocitos- con la apoptosis inducida por caspasas.

Algunos de los daños de los espermatozoides que hemos observado en el semen de los pacientes infértiles con IGU, como son la “descompactación” de la cromatina, pudieran ser secundarios a la fragmentación de la cromatina, un hallazgo característico de la apoptosis; mientras que la fagocitosis de espermatozoides pudiera resultar del reconocimiento de células apoptóticas. La coincidencia de cambios autolíticos en espermatozoides que contenían bacterias a nivel de la pieza media podría estar en relación con incremento de la concentración de cisteín-proteasas y la inducción de apoptosis.

En décadas pasadas, estudios ultraestructurales permitieron identificar defectos morfológicos de los espermatozoides, como la agenesia acrosomal, la ausencia de brazos de dineína y otros defectos axonemales, la disociación centriolar, la displasia de la vaina fibrosa (Afzeluis *et al.*, 1995; Chemes *et al.*, 1998; Courtade *et al.*, 1998; Chemes y Rawe, 2003). Sin embargo, no existen estudios sistemáticos enfocados a describir los cambios inflamatorios del líquido seminal en pacientes con IGU, ni las anomalías asociadas de la morfología de los espermatozoides, ni de las células germinales inmaduras presentes en el líquido seminal de estos pacientes con IGU.

Se ha considerado que, en contraparte de los fenotipos alterados de orden genético, los defectos adquiridos de los espermatozoides comprenden un patrón heterogéneo de anomalías que se distribuyen al azar y no en forma universal. Se trata de cambios que no son de presentación familiar y son debidos a factores endógenos o exógenos que pueden disminuir o corregirse con tratamientos. Entre estas anomalías, se han descrito en pacientes infértiles alteraciones flagelares y cefálicas inespecíficas: las primeras consisten en alteraciones del número y ubicación de los microtúbulos del axomena, que no son detectados en los exámenes rutinarios del líquido seminal, pero que constituyen la base de



la astenozoospermia (Chemes y Rawe, 2003). La poca claridad que aún existe respecto a las causas de esta condición determina que el tratamiento sea frecuentemente empírico.

Dentro de la andrología, los estudios de la patología de los espermatozoides se centran en caracterizar los defectos estructurales y funcionales de los espermatozoides anormales, cuya utilidad sería identificar los mecanismos de ineficiencia de los espermatozoides, la definición de fenotipos genéticos y de estrategias para incrementar la capacidad de fertilizar, abriendo las posibilidades para estudios genéticos moleculares, los cuales muy probablemente conduzcan al diseño de las herramientas terapéuticas futuras de los pacientes infértiles (Chemes y Rawe, 2003). Los estudios que comprendan un abordaje clínico y seminológico sistemático, sobre la base de una evaluación en cortes semifinos y ultrafinos de la patología de los espermatozoides, pueden proporcionar una visión integral de la problemática en los casos de infertilidad de causa no conocida. En el caso concreto de las IGU, la observación de cambios citológicos ultraestructurales relacionados con procesos inflamatorios, desencadenados por la presencia de gérmenes en el líquido seminal, ha sido indicativo de la importancia patogénica de los gérmenes como causa de las alteraciones morfológicas de los espermatozoides y, en definitiva, como causa de infertilidad en el varón con IGU (Gallegos, 2005).

No obstante, en la actualidad aún es motivo de controversia la relación directa que la leucocitospermia tiene con la fertilidad, mas la relación que este fenómeno tiene con la infección genital es un hecho bien comprobado ya que ésta se correlaciona con el aumento de leucocitos en el líquido seminal (Trum *et al.*, 1998, Gallegos *et al.*, 2008a).

En un estudio de 135 pacientes, 77% fueron positivos para DNA bacteriano, pero sólo 23% presentaban inflamación, esto es número de leucocitos seminales superior a 1 millón por mL (Hua y Schaeffer, 2004). La gran variación en la cifra de leucocitos presentes en el líquido seminal, dificulta la correlación directa entre la presencia de esas bacterias y la infección prostática y seminal. Los marcadores moleculares como son la elastasa producida por los granulocitos polimorfonucleares el principal tipo de células inflamatorias presentes en las infecciones seminales, la concentración de ROS y, por último, los niveles de citocinas en el plasma seminal (IL6 e IL8) se han considerado útiles para el diagnóstico de las infecciones glandulares del tracto genital masculino (Krause *et al.*, 2003).

De otra parte, la observación directa al microscopio óptico y la realización de tinciones simples no ha permitido establecer, por sí solas, unos criterios fidedignos y

fácilmente reproducibles de diagnóstico diferencial entre los leucocitos y las células germinales inmaduras en el semen infectado en cambio, el uso de la técnica de peroxidasa permite identificar el tipo de leucocitos de mayor prevalencia. Esta técnica resulta recomendable para la detección de cambios inflamatorios en el semen (Wolf, 1998); pero al igual que ocurre con la tinción supravital con rojo neutro (Benítez *et al.*, 1996), la técnica de peroxidasa exige la integridad de la membrana plasmática leucocitaria y la conservación de su contenido lisosomal, por lo que fenómenos de autólisis y depleción del contenido enzimático, tan frecuentes en procesos de inflamación y actividad fagocítica, podrían interferir con la interpretación del significado clínico de los resultados de estas pruebas de laboratorio de seminología. Esto pudiera explicar, al menos en parte, la controversia existente acerca de las cifras de leucocitos, en relación con la etiopatogenia de la infertilidad asociada a IGU (Munuse *et al.*, 1999; Ochsendorf *et al.*, 1999).

En el presente estudio, la observación de células de inflamación con signos morfológicos de actividad fagocítica contra bacterias y espermatozoides permite claramente abogar por una participación directa de las células inflamatorias en los procesos patológicos secundarios a la infección del tracto genital y que son causa de la subfertilidad de la pareja con IGU.

Numerosos estudios han fundamentado la importancia del proceso inflamatorio por vía de la producción de ROS en la infertilidad masculina (Álvarez y Storey, 1998; Saleh *et al.*, 2002; Aitken *et al.*, 2003 Agarwal y Prabakaran, 2005); sin embargo, la importancia de estas moléculas en los aspectos reproductivos de la mujer apenas empieza a vislumbrarse. Agarwal y Allamaneni (2004), han sugerido que el estrés oxidativo en los folículos ováricos provoca daño directo en los ovocitos, y que el estrés oxidativo en la cavidad peritoneal lesiona en forma directa a los óvulos y a los espermatozoides, de la misma forma que el de la trompa uterina causa daño directo en el embrión. Enfermedades comunes en la mujer infértil, como lo es la endometriosis, pueden ser desencadenadas por ROS. La identificación del origen de la generación excesiva de oxígeno reactivo y el tratamiento específico de la causa primaria aún está por definirse (Agarwal y Allamaneni, 2004). En la actualidad, las IGU, se consideran más como una patología de la pareja, y son una causa común de infertilidad en el hombre y en la mujer, en la que la producción de ROS constituye un mecanismo de daño celular y molecular en los órganos y tejidos genitales y concretamente en los gametos. De hecho, la membrana del espermatozoide es particularmente susceptible al stress oxidativo, por su alto contenido de ácidos grasos

insaturados, los cuales son necesarios para conseguir la fluidez adecuada para participar en los eventos de fusión de membranas de los gametos durante la fertilización (Krause *et al.*, 2003).

Otro mecanismo molecular de daño funcional de la membrana del espermatozoide en pacientes con IGU pudiera estar relacionado con el mecanismo de la adhesión del cuerpo elemental de *Chlamydia trachomatis*. Este proceso se basa en el incremento de la fosforilación de la tirosina presente en proteínas de la membrana del flagelo del espermatozoide, lo que probablemente acelerará la capacitación del espermatozoide que debe suceder justo antes de la fertilización (Hosseinzadeh *et al.*, 2000). Este mismo grupo de investigadores ha descrito que la co-incubación *in vitro* de espermatozoides sanos con *Chlamydia trachomatis*, provoca deterioro de la motilidad y desarrollo de necrozoospermia (Hosseinzadeh *et al.*, 2001).

Se ha comunicado que los procesos infecciosos ocasionados por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, bacterias productoras de ROS, particularmente del ion superóxido y de peróxido de hidrógeno, están implicados en la muerte de los espermatozoides. Las infecciones por estos patógenos están relacionadas con la inducción descontrolada de apoptosis espermática, que ocurre de forma normal en células espermátogénicas y espermatozoides como un mecanismo de regulación de la espermátogénesis (Holstein *et al.*, 2003). En procesos infecciosos, la liberación de citocinas o los productos de secreción de las bacterias conduce a la apoptosis espermática por el contacto directo con la membrana del espermatozoide.

En sus estudios Gorga *et al.* (2001) y Satta *et al.* (2006), concluyeron que la composición molecular de la membrana de *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, podrían ser inductores directos de la apoptosis espermática. En la membrana celular de estas bacterias se encuentran moléculas como las porinas y los lipopolisacáridos que se ha visto, son agentes que inducen el inicio de la apoptosis en los espermatozoides cuando son expuestos a estas moléculas nocivas (Gorga *et al.*, 2001; Satta *et al.*, 2006).

En un estudio reciente de nuestro grupo (Ramos-González, 2011) se evidenció la ausencia de halo de dispersión de la cromatina y la degradación nuclear en un porcentaje equiparable con la presencia de espermatozoides muertos diagnosticados mediante la prueba de vitalidad espermática con Eosina Y. El comportamiento de ambos parámetros fue muy similar, encontrando que a medida que se incrementaba el número de células

muertas, el número de núcleos degradados y espermatozoides sin halo también se incrementaba.

Por otra parte, el daño en el ADN del espermatozoide y la necrozoospermia, se han asociado también con la presencia de varicocele. Estudios recientes han demostrado que los pacientes con varicocele presentan frecuencias altas de ADN fragmentado comparado con los hombres fértiles. Entre los antecedentes clínicos referidos por los pacientes de nuestro estudio, el varicocele estuvo presente en 24 de ellos, siendo bilateral en 9 casos y unilateral los restantes.

La investigación de mecanismos de patogenicidad, factores de cronicidad, respuesta a tratamientos, y la definición de estrategias de prevención para las infecciones por *Chlamydia trachomatis* son de interés creciente. En la actualidad, *Chlamydia trachomatis* sigue siendo considerado el germen de transmisión sexual más común en los países industrializados y se estima que cada año se presentan 92 millones de casos nuevos en el mundo; además, en el lapso de 15 años, se ha registrado un incremento notable en el número de casos publicados: 78,5 por cada 100.000 habitantes en 1987 a 404 casos por cada 100.000 habitantes en el año 2000 (Norman, 2002). En épocas pasadas se calculaba que la infección genital por *Chlamydia trachomatis* tenía una prevalencia de más del 20% en personas sexualmente activas, pero de los estudios epidemiológicos más recientes se ha concluido que al menos uno de los dos cónyuges es positivo para *Chlamydia trachomatis*, y asimismo, la probabilidad de que ambos cónyuges estén afectados es del 40 al 60% y que el riesgo de transmisión materno fetal es del orden del 50% (Norman, 2002). En nuestro estudio las cónyuges de los pacientes subfértiles con IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* presentaban la misma infección y presentaban un cuadro clínico con mayor sintomatología que los varones.

La expresión clínica más común de la infección genital por *Chlamydia trachomatis* en el hombre, la constituyen la uretritis y la epididimitis, y en la mujer la salpingitis. A pesar de que las infecciones no complicadas son a veces asintomáticas y clínicamente indolentes, sus secuelas son frecuentemente causa de infertilidad conyugal, de complicaciones obstétricas, incluidas el aborto repetitivo (Vigil *et al.*, 2002a) y de secuelas prolongadas en los hijos recién nacidos (Mardh, 2002; González *et al.*, 2004).

Otros aspectos de la infertilidad de la pareja pudieran estar relacionados con la coexistencia de infecciones mixtas por *Chlamydia trachomatis* y por Virus del Papiloma Humano, y aunque recientemente algunos autores han fallado en la comprobación del

efecto cooperador entre estos dos tipos de microorganismos en la producción de carcinoma del cuello uterino (Luostarinen *et al.*, 2004), en años precedentes se ha venido insistiendo en que *Chlamydia trachomatis* pudiera relacionarse con el desarrollo de neoplasias del aparato genital femenino, incluyendo el cáncer del cuello uterino y de ovario. En la inflamación pélvica crónica de mujeres con IGU crónica por *Chlamydia trachomatis* se ha encontrado una asociación de los niveles elevados de marcadores tumorales del cáncer de ovario secundarios, con el daño tisular causado por ooforitis severa (Pavoneen, 2001). *Chlamydia trachomatis* particularmente el serotipo G está presente en áreas de metaplasia escamosa y eversión glandular endocervical causada por el Virus del Papiloma Humano, sospechándose que es importante como causa de carcinoma escamoso del cuello uterino (Anttila *et al.*, 2001).

En cultivos de células HeLa y cultivos primarios de células epiteliales del cérvix uterino infectados por *Chlamydia trachomatis*, se destruyen los complejos de unión intercelular dependientes de N-caderina y se disocian el complejo N-caderina/ $\beta$ -catenina. Al parecer Clamidia secuestra la  $\beta$ -catenina en sus cuerpos de inclusión citoplásmica (Prozialeck *et al.*, 2002). Cada uno de éstos hallazgos puede tener implicaciones importantes en la fisiopatología de los daños que causa la bacteria. La pérdida de adhesión intercelular mediada por la N-caderina puede facilitar la permeabilidad epitelial intercelular y favorecer la inflamación. En este sentido, se ha sugerido que una respuesta secretoria o descarga acuosa intercelular en relación con la susceptibilidad a infecciones por otros gérmenes tales como el VIH, para el cual se ha documentado desde hace ya algún tiempo, que existe un sinergismo epidemiológico con otros gérmenes de transmisión sexual (Wasserheit, 1992). El secuestro de la  $\beta$ -catenina en los cuerpos de inclusión Clamidiales pudiera proteger a la célula infectada de sufrir apoptosis, favoreciendo que el germen tenga el tiempo necesario para cumplir su ciclo de desarrollo (Prozialeck *et al.*, 2002).

En el caso del cáncer de próstata, se ha encontrado una asociación entre la prostatitis crónica y el carcinoma prostático, lo que sugiere que el proceso inflamatorio crónico pudiera ser inductor de transformación neoplásica (Roberts *et al.*, 2004). Carver *et al.*, (2003) demostraron que hombres con prostatitis severa tienen niveles séricos de antígeno prostático significativamente más elevados que los encontrados en pacientes sin prostatitis; en este estudio se consideró como criterio de inflamación la presencia de más de 10 leucocitos por campo de gran aumento en la secreción prostática (Carver *et al.*, 2003). Algunos autores han propuesto la investigación rutinaria de antígeno prostático en

pacientes con prostatitis severa, en base a que este marcador incrementa el valor predictivo de la biopsia, respecto a la positividad para cáncer prostático, desde 37% al 51% (Potts, 2000).

Con todo, no hay estudios que definan claramente el papel de las prostatitis crónicas en la etiología del cáncer prostático, pero como ocurre en cualquier otro microambiente de inflamación crónica, el estímulo prolongado por moléculas reactivas, como los ROS, pudiera representar una condición elemental para la transformación neoplásica. En el examen histopatológico de especímenes obtenidos por prostatectomía radical, el infiltrado inflamatorio crónico se asoció con cáncer prostático en el 57,5% de los casos; adicionalmente la tinción para bcl-2, -un modulador antiapoptósico implicado en el desarrollo de la hiperplasia benigna de la próstata y del cáncer de la próstata- se vió intensificada en áreas de prostatitis y en áreas de glándulas benignas rodeadas por acinos malignos (Gerstenbluth *et al.*, 2002).

Nuestro grupo llevó a cabo un estudio comparativo para determinar la presencia de *Chlamydia trachomatis* en tejido hiperplásico de la próstata y biopsias de carcinoma protático, y hemos encontrado que la prueba de IFD fue positiva en 18 de 20 casos con carcinoma, mientras que 12 de 20 casos de hiperplasia fueron positivos para ésta bacteria (datos no publicados). Suponemos que *Chlamydia trachomatis* pueda tener una cierta importancia etiopatogénica en relación con el cáncer de próstata (Gallegos-Avila, *et al.*, 2009).

La elevada proporción de enfermedad asintomática y la serie de secuelas cicatriciales que se instalan silenciosamente determinan que las infecciones Clamidiales constituyan un importante problema de salud. Por tanto, la búsqueda prospectiva, sistemática y rigurosa de infecciones genitales por Clamidia en la pareja determinará un positivo progreso en el control oportuno y en la prevención de esta enfermedad de transmisión sexual (Westrom, 1990; Fenton, 2000).

Existen pocos estudios centrados en la clamidiosis genital y, por tanto, pocos datos acerca de la presencia de Clamidia en el eyaculado y su potencial influencia en su calidad y en la morfología de los espermatozoides, pero la importancia de la *Chlamydia trachomatis* en la infertilidad masculina se ha ido esclareciendo recientemente. Nuestros resultados en hombres infértiles han demostrado que la Clamidia juega un papel importante en la generación de daño de los espermatozoides y de la vía espermática, lo cual también lo hemos constatado en casos en los que la prueba de IFD en uretra había sido negativa.

Veznik *et al.*, (2004), estudiaron 627 muestras de semen de donadores sin antecedentes de infección y encontraron un 21,7% de muestras positivas para *Chlamydia trachomatis* por IFD, que se asociaron con alteraciones en el volumen seminal, en el recuento, motilidad y velocidad de los espermatozoides, así como en el porcentaje de formas anormales, que fue mayor en el grupo positivo para *Chlamydia trachomatis* que en el negativo. La teratozoospermia en los positivos fue de más de 65% de formas anormales y las alteraciones en la cabeza fueron las más frecuentes en un 50,28%. El tratamiento de tres meses con azitromicina redujo las alteraciones del seminograma y consiguió una negativización significativa en el 61,5% de los casos. En el grupo de pacientes positivos para *Chlamydia trachomatis*, la frecuencia de las alteraciones morfológicas de los espermatozoides son el resultado de la presencia del germen en el parénquima testicular, afectándose tanto el epitelio seminífero como el intersticio. La disminución en la función del espermatozoide se relacionó con la presencia del agente en el acrosoma o en el espacio sub-membranoso de la pieza intermedia, además de ser la causa de la reducción de la resistencia de la membrana y de la disminución de su viabilidad. Dado que *Chlamydia trachomatis* es un posible factor de patología del espermatozoide y de la vía espermática, se ha sugerido que se realicen pruebas de escrutinio para el diagnóstico de la clamidiosis en hombres asintomáticos, ya que esta enfermedad afecta silenciosamente a órganos internos y tiende a la cronicidad. También se ha sugerido la importancia de su búsqueda intencionada, como medida preventiva en los programas de reproducción asistida (Veznik *et al.*, 2004).

Varias especies de *Mycoplasma* han sido implicadas -por sí solas o asociadas a infecciones por *Chlamydia trachomatis* como agentes causantes de un número apreciable de infecciones del tracto genitourinario. *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma genitalium* son bacterias de transmisión sexual que colonizan la uretra de hombres sexualmente activos y que pueden permanecer asintomáticos por largo tiempo. Se ha comentado previamente que estos gérmenes se encuentran presentes en un porcentaje variable de uretritis no gonocócicas; no obstante, el diagnóstico de uretritis por *Mycoplasma* se realiza muchas veces por exclusión, ya que, si bien se ha documentado que este germen se encuentra presente en el 30 a 40% de hombres normales, su aislamiento puede explicar un proceso infeccioso de la vía genitourinaria (Moskowitz y Mellinger, 1992).

Se han publicado múltiples evidencias de que los microorganismos presentes en el líquido seminal interactúan físicamente con los espermatozoides (Svenstrup *et al.*, 2003). Respecto a *Mycoplasma genitalium*, se ha demostrado que se adhiere a todas las partes del espermatozoide, pero preferentemente al cuello y a la pieza media, y que puede causar aglutinación e inmotilidad de los espermatozoides. En el caso de *Ureaplasma urealyticum*, de *Neisseria gonorrhoeae*, de *Chlamydia trachomatis* y de *Escherichia coli* se demostró la unión de estos gérmenes a la cola, pieza media y cabeza del espermatozoide. Se ha observado que *Chlamydia trachomatis* se une a la pieza media de espermatozoides obtenidos de fluido peritoneal, lo que permite suponer que el espermatozoide es capaz de transportar la Clamidia en la pieza media. *Escherichia coli*, se une y aglutina espermatozoides: casi el 100% de células de la línea germinal fueron aglutinadas después de 60 minutos. La adhesión de *Mycoplasma genitalium* al espermatozoide parece estar mediada por el extremo elongado de la bacteria, y, aunque no se sabe si la unión es específica, parece ser que el receptor de las células es probablemente un sialoglico-conjugado (Svenstrup *et al.*, 2003).

En nuestro estudio, el diagnóstico microbiológico del líquido seminal no contempló al *Mycoplasma genitalium*, por lo que la presencia de partículas de forma y tamaño compatibles con la especie *Mycoplasma* en los cortes semifinos en los casos en que las especies de *Mycoplasma* investigadas no estuvieron presentes, pueden considerarse sugestivos de la participación de ese germen en la IGU de un número apreciable de pacientes infértiles. Estas partículas tipo *Mycoplasma* se observaron libres en el espacio extracelular, pero también adheridos e incluidos en el citoplasma de las células inflamatorias y de los espermatozoides aun en pacientes con cultivo de *Mycoplasma* negativo. La eventual posibilidad de una viabilidad bacteriana reducida o de una concentración bacteriana inferior al límite de sensibilidad del método de cultivo empleado para el aislamiento e identificación del *Mycoplasma* pudo haber generado falsos negativos; estas consideraciones podrían explicar las discrepancias encontradas entre los datos microbiológicos y la observación casi constante de partículas mycoplásmicas en el semen de los hombres infértiles que se incluyeron en éste estudio.

Se ha considerado que la recuperación de espermatozoides por *swim up* remueve microbios de las células germinales. No obstante, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum* se encontraron adheridos a espermatozoides después del *swim up*, aunque no



se sabe si estas células fueran capaces de infectar y causar infertilidad en mujeres (Knox *et al.*, 2003; Svenstrup *et al.*, 2003).

Varios estudios han documentado una asociación entre *Ureaplasma urealyticum* e infertilidad. Gnarpe y Friberg en 1972, observaron una prevalencia de 85% en cultivos de hombres infértiles, muy diferente de la encontrada en hombres fértiles (27%). Fowlkes *et al.*, (1975), evaluaron 625 hombres con infertilidad de etiología desconocida y encontraron una correlación entre el cultivo positivo para *Ureaplasma urealyticum*, con una disminución de la motilidad e incremento de defectos morfológicos del espermatozoide, asociándose frecuentemente a una disminución de su capacidad fecundante (Fowlkes *et al.*, 1975). Sin embargo, otros autores no lograron evidenciar dicha relación entre infertilidad masculina e IGU por *Ureaplasma urealyticum* (De Louvois *et al.*, 1974; Talkington *et al.*, 1991; Andrade-Rocha, 2003).

En IGU, el daño sobre la estructura, función e integridad genética de los espermatozoides y por lo tanto su capacidad fecundante puede estar condicionado, en parte, por la concentración de bacterias y la localización del foco de infección, el tiempo de evolución, el establecimiento o no de secuelas cicatriciales y la permanencia de los espermatozoides en contacto con las bacterias y con las células inflamatorias.

No se conoce fehacientemente la incidencia de infecciones por *Chlamydia trachomatis* y bacterias de la especie *Mycoplasma* en pacientes con esterilidad, aborto recurrente, embarazo ectópico, ruptura prematura de membranas placentarias, procedimientos de reproducción asistida fallidos (Gaudoin *et al.*, 1999), y su impacto con respecto de las alteraciones de la calidad seminal (Greendale *et al.*, 1993); y esta carencia de datos se puede deber a la aplicación de criterios de estudio diferentes en la selección y la aplicación distintos de métodos diagnósticos; por ello, actualmente aún no existe un consenso acerca de la frecuencia real de IGU y de su repercusión sobre la salud reproductiva conyugal (Ness *et al.*, 1997; Wolf, 1998; Villanueva-Díaz *et al.*, 1999; Trum *et al.*, 2000). Al menos en parte, esto es debido a que el diagnóstico rutinario de *C. trachomatis* y bacterias de la especie *Mycoplasma* es todavía poco accesible, lo que dificulta establecer su relación con la infertilidad. *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma genitalium*, necesitan de condiciones especiales para su crecimiento, no forman colonias macroscópicas y la identificación por un cambio de color en el medio de cultivo selectivo para el caso del *Mycoplasma*, puede ser susceptible, en algunos casos, de interpretación errónea. El diagnóstico de estos gérmenes puede quedar

fuera del alcance también, debido a que las muestras analizadas no sean representativas de la región del tracto genital infectada.

Pruebas moleculares, como la PCR, y la reacción en cadena de la ligasa, que se han propuesto para el diagnóstico de *Ureaplasma urealyticum* y *Chlamydia trachomatis* (Dille *et al.*, 1993; Pannekoek *et al.*, 2003), son por la tecnología requerida y el costo de su realización, poco aplicables en estudios rutinarios o rastreo de enfermos o portadores sanos, cuando se evalúan grandes poblaciones. En el caso de Clamidia, el médico frecuentemente recurre a métodos indirectos, como sería la determinación de anticuerpos contra Clamidia en el suero sanguíneo que, al no dar información acerca del o de los sitios infectados ni de los cambios inflamatorios acompañantes, limitan la precisión de los mecanismos de patogenicidad implícitos en éste proceso infeccioso y en sus secuelas. En definitiva, en la actualidad todavía existen limitaciones para determinar la importancia de las IGU en particular las de tipo inespecífico- como causa de infertilidad conyugal, debido al nivel superficial con el que se evalúa el líquido seminal en las clínicas de reproducción, donde normalmente el objetivo de esa evaluación es diagnosticar un potencial de fertilidad y no el indagar sobre las causas o mecanismos que conducen al deterioro de la capacidad fecundante del espermatozoide. Pero además, la consideración de la pareja como unidad de diagnóstico, tratamiento y pronóstico de las IGU es también una de las limitaciones en la evaluación clínica, debido a la exigencia de mayor tiempo de estudio y preparación especializada multidisciplinaria en andrología y en ginecología.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, hemos identificado los tipos de gérmenes mas frecuentemente presentes en las IGU de varones infértiles y las alteraciones seminales asociadas al proceso de infección seminal. Se ha precisado que la *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, estuvieron también presentes en un alto porcentaje de pacientes con esterilidad e infección del liquido seminal (Gallegos *et al.*, 2000).

De otra parte, cuando cotejamos los datos obtenidos a partir de la detección de *Ureaplasma urealyticum* en semen por métodos moleculares, con los obtenidos mediante métodos de cultivo en medios específicos, la frecuencia de casos con infecciones causadas por *Mycoplasma sp.*, fue significativamente mayor cuando la detección se realizó mediante métodos moleculares (Díaz-Gutiérrez y Gallegos, 1999; Díaz, 1999).

En las IGU del varón, nuestro grupo ha descrito un perfil de las alteraciones ultraestructurales de los espermatozoides en hombres con infertilidad de causa no conocida (Gallegos y Ramírez, 1994a; Gallegos *et al.*, 2008b); asimismo referimos la presencia de

fagocitosis de espermatozoides y de células germinales inmaduras en estos pacientes (Gallegos *et al.*, 2008b). Recientemente precisamos el patrón de daño espermático evaluado con microscopía de luz en frotis de semen, aplicando criterios morfológicos estrictos en pacientes infértiles con IGU por *C. trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, (Gallegos-Ávila *et al.*, 2008a). No obstante, es necesario destacar que algunos de los hallazgos ultraestructurales de la citología seminal de pacientes infértiles con infecciones por *Chlamydia trachomatis* y *Ureaplasma urealyticum* no son completamente específicos, ya que también se observaron en otras patologías relacionadas con la infertilidad, tal como lo es el varicocele en pacientes sub-fértiles (Gallegos y Villarreal, 1998).

En la evaluación diagnóstica de Clamidia y Mycoplasma en el líquido seminal, técnicas altamente específicas como la inmunoquímica (Del Guidice *et al.*, 1979) o el diagnóstico molecular (Trum *et al.*, 2000), han ido desplazando a los métodos morfológicos. Sin embargo, los métodos citológicos y bacterioscópicos pueden ser muy adecuados cuando se aplican en estudios numerosos, en muestras abundantes, que contengan varios tipos de gérmenes, o cuando las cantidades de gérmenes sean muy pequeñas. En la actualidad aún no se ha diseñado una prueba que, como las bacterioscópicas, permitan la observación y cuantificación a la vez todos los patógenos potencialmente causantes de IGU. Las pruebas existentes en la actualidad tienen limitaciones con respecto a su sensibilidad, especificidad y/o velocidad en la obtención de resultados, por lo que se sugiere utilizar, en lo posible, la combinación de varios métodos diagnósticos; pero, con todo, en un 30-60 % de los casos no se logra identificar el o los agentes etiológicos causantes de IGU.

Por todo ello, consideramos que la evaluación de las alteraciones seminales, apoyada en el análisis citomorfológico de cortes semifinos de las células contenidas en el líquido seminal, permite relacionar más claramente los datos clínicos acompañantes de las IGU, así como los mecanismos íntimos de lesión que cada tipo particular de bacterias produce sobre los espermatozoides y su significado patogénico en relación con la infertilidad conyugal.

La sistemática evaluación citológica del corte semifino y ultrafino del líquido seminal permite detectar partículas bacterianas, incluso cuando su número es muy bajo, y otros métodos más sofisticados son incapaces de identificarlos. Si bien el examen ultraestructural del líquido seminal obtiene mayor eficacia diagnóstica, el largo tiempo empleado en el estudio de la muestra y la gran pericia exigida al evaluador determinan un

uso muy restringido de la microscopía electrónica en el estudio del líquido seminal. Debe considerarse que el rendimiento práctico es mucho mayor cuando se evalúa el líquido seminal mediante un corte semifino, dado que el examen puede ser mucho más exhaustivo y la cantidad, de muestra valorada es mayor. Además, los cortes semifinos del líquido seminal también permiten localizar e identificar los gérmenes en relación con las distintas células germinales del eyaculado, así como determinar el tipo de células inflamatorias y su acción fagocítica. Este método citológico permite precisar en forma determinante y estrictamente, la severidad del daño de los espermatozoides y de otras células germinales inmaduras y epiteliales presentes en el semen de pacientes con IGU.

En definitiva, los métodos microbiológicos, en general, aún siendo de elevada sensibilidad y especificidad, tienen limitaciones diagnósticas que pueden depender principalmente del muestreo. La búsqueda de *Clamidia* en el exudado uretral puede ser incapaz de detectar infecciones de sitios profundos de la vía seminífera; así mismo, el cultivo de *Mycoplasma* exige un mínimo de concentración bacteriana para su eficacia. El estudio en cortes semifinos y finos del semen supera estas limitaciones y complementa a las pruebas microbiológicas, al incluirse datos del significado patogénico de los gérmenes presentes. Una clara asociación entre el fenómeno de fagocitosis de los espermatozoides y la presencia de bacterias en cantidad abundante, incorporadas a vacuolas fagocíticas y acompañando a los espermatozoides, evidencia la importancia de la infección en la inducción de la leucocitospermia, cuyo impacto en la fertilidad aún no está completamente reconocido. La astenozoospermia que frecuentemente se asocia a las infertilidad masculina puede deberse a la incorporación de *Mycoplasma* y *Clamidia* en la pieza media del espermatozoide y su adherencia a la pieza principal del flagelo. Infecciones clínica y bacteriológicamente ocultas de la vía seminífera pueden ser descubiertas por el estudio citomorfológico en cortes semifinos y finos.

Aunque la comparación no sea clara por el empleo de diferentes métodos diagnósticos, en anteriores estudios efectuados en México, la incidencia de infección genital por *Chlamydia trachomatis* ha variado entre 6,7% en 1,100 mujeres de una clínica de planificación familiar en Mérida, Yucatán (Canto-de Cetina *et al.*, 2003), 7,3% en mujeres de un hospital rural de Tlacolula, Oaxaca (Acosta-Cázares *et al.*, 1996), 25% en trabajadoras de sexo comercial, 3,6% en mujeres del programa de control prenatal, 16,8 en hombres no homosexuales (Cravioto *et al.*, 2003), y 28,4% de mujeres con IGU (Rosas-Arceo *et al.*, 1993). En el grupo de hombres infértiles que nosotros estudiamos, la

incidencia de infección por *Chlamydia trachomatis* fue mucho más elevada, ya que aunque la prueba de IFD en uretra masculina fue positiva en el 35.6%, el estudio de cortes semifinos del líquido seminal detectó la existencia de cuerpos elementales de Clamidia en el 96.5% de los pacientes infértiles, mientras que la IFD de exudado cérvico-vaginal de las cónyuges de esos pacientes fue positiva en el 95%.

A pesar de que se ha considerado que la colonización de la uretra del varón y de la mujer por micoplasmas genitales sucede en la pubertad, generalmente por el inicio de la actividad sexual, y que estas bacterias existen ubicuamente en portadores sanos asintomáticos, múltiples evidencias señalan su importancia patogénica en desórdenes reproductivos (Cassel *et al.*, 2000). Hasta donde hemos investigado, no existen en México estudios epidemiológicos acerca de infección por micoplasmas genitales en hombres con infertilidad, ni publicaciones acerca del significado patogénico de la presencia de esas bacterias en el líquido seminal. En 1991, Rosas Arceo *et al.*, encontraron 39% de un grupo de 67 mujeres con infertilidad por patología tubárica positivos para un cultivo de *Mycoplasma* en el líquido peritoneal, mientras que en pacientes sin problema tubáricos se identificaron 28% de cultivos positivos. Investigando en suero sanguíneo la presencia de anticuerpos contra *Mycoplasma genitalium*, Clausen *et al.*, (2001) detectaron un 22% de mujeres con infertilidad por patología tubárica e infección por *Mycoplasma*. En ese mismo estudio se detectaron por ELISA, 56,8% de mujeres con daño tubárico, que fueron seropositivas para *Chlamydia trachomatis*. La búsqueda directa de estas bacterias en secreciones genitales de parejas infértiles llevada a cabo en nuestro estudio fue más eficiente para detectar la presencia de *Mycoplasma*. Aplicando técnicas de aislamiento e identificación en medios selectivos específicos para micoplasmas genitales, nosotros detectamos un porcentaje mayor (67,8%) de casos con infección por *Mycoplasma* en nuestra población. Con microscopio electrónico de transmisión se detectaron partículas bacterianas compatibles con *Mycoplasma* en el 95,1% de los casos.

La presencia de *Ureaplasma urealyticum* se ha asociado a *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum*, los cuales son más frecuentes en las parejas de mujeres con vaginosis bacteriana y cultivos de *Mycoplasma* positivos (Keane *et al.*, 2000), por lo que, ante la presencia de micoplasmas en casos de vaginosis o sintomatología de infección genital interna, puede suponerse que el cónyuge sea portador del mismo germen. De otra parte, la presencia de *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis* en el varón ha sido asociada a uretritis, litiasis urinaria, epididimitis y prostatitis

crónica (Brunner *et al.*, 1983; Andrade- Rocha, 2003), y, aunque estas bacterias han sido aisladas del tracto urinario superior, sólo en pocos casos existen síntomas agudos (Cassel *et al.*, 2000). En una amplia casuística que incluyó 1416 varones infértiles y 375 hombres fértiles se detectaron mediante técnicas de inmunofluorescencia directa 38,7% de casos de infección seminal por *Ureaplasma urealyticum* en los pacientes infértiles y 9% en el grupo control (Xu *et al.*, 1997). En nuestro estudio, al igual que en el de estos autores confirmamos la infección seminal por micoplasmas genitales y demostramos la adhesión del Mycoplasma a la membrana plasmática de los espermatozoides, a nivel de la pieza media y región cefálica del espermatozoide y adheridas células germinales. Imágenes compatibles con la presencia de bacterias que por su morfología son compatibles con esta especie bacteriana, sugieren su incorporación al citoplasma periflagelar del espermatozoide, lo que, aunado a la adhesión y englobamiento de las partículas micoplásmicas en células inflamatorias, confirma la importancia patogénica de éste germen en los casos de infertilidad.

Las infecciones inespecíficas del aparato genitourinario, particularmente las causadas por Clamidia y Mycoplasma, se vienen asociando a la infertilidad conyugal y a otros trastornos de la reproducción, afectando un número cada vez mayor de parejas, y generan un impacto en la salud materno infantil. Tal es el caso de la creciente incidencia de embarazo ectópico, de aborto temprano y recurrente y de ruptura prematura de membranas; así como de lamentables condiciones como la muerte fetal in útero, la septicemia materna y fiebre post parto; de las graves infecciones respiratorias y del sistema nervioso del recién nacido y del lactante; de las otitis, conjuntivitis, sinusitis y faringoamigdalitis, crónicas y resistentes a tratamiento; de las artritis, endocarditis e incluso algunos padecimientos hepáticos (Cassel *et al.*, 2000; Schachter y Grossman, 2001; Ponsioen *et al.*, 2002; Bucurescu y Stiertz, 2003; Fenollar *et al.*, 2004; Numazaki *et al.*, 2004). En todos estos casos, el descubrimiento de infecciones genitales ocultas en la pareja adquiere entonces mayor importancia.

Además de cambios en el comportamiento sexual, condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de éstos gérmenes (calor y humedad), asociadas a la falta de hábitos de higiene, pueden explicar las diferencias en la prevalencia de las infecciones por Clamidia y Mycoplasma en distintas poblaciones y zonas geográficas. La transmisión no sexual por manos, toallas y otros objetos contaminados, a partir de secreciones conjuntivales y respiratorias, puede ser un factor de expansión y crecimiento exponencial

de las infecciones genitales por gérmenes que, como *Clamidia* y *Mycoplasma*, afectan también al árbol respiratorio superior, y tienen como reservorio el saco conjuntival, la nasofaringe y la orofaringe. En las muestras seminales de los pacientes infértiles que estudiamos, fue común observar células epiteliales esfaceladas de la vía seminífera, conteniendo bacterias en su interior. En su ciclo de desarrollo, la *Clamidia*, se perpetúa al “incubarse” dentro de las células infectadas. Estudios de viabilidad bacteriana en exfoliados celulares libres de cuerpos elementales podrían aclarar hasta qué punto y por cuánto tiempo, son infectantes las células epiteliales que contienen cuerpos reticulares de *Clamidia* en su citoplasma.

EL análisis cuantitativo y semicuantitativo de los cambios seminales asociados a la IGU puede ser aprovechado para estudios de correlación con parámetros seminales, comúnmente alterados en hombres infértiles, como la disminución en la concentración y motilidad del espermatozoide, que aún siguen siendo tratados empíricamente. Una vez comprendido el significado ultraestructural de alteraciones morfológicas de los espermatozoides en las IGU, el estudio mediante métodos citológicos más sencillos, como lo es el corte semifino o la citología en fresco con técnicas de alta resolución y alto contraste puede ser utilizado en el diagnóstico aproximado de lesiones del espermatozoide por infección y su monitorización bajo tratamiento.

La creciente incidencia de enfermedades por gérmenes de transmisión sexual que, siendo contraídos a temprana edad, afectan la fertilidad en las etapas tardías del padecimiento, produce una mayor importancia de esta problemática, a personas que han planificado la paternidad, en espera de las condiciones socioculturales que aseguren el porvenir de los hijos y genera en países sub-desarrollados un crecimiento de la población a expensas de las clases desprotegidas.

Así, resulta importante el reconocimiento oportuno de las IGU y su tratamiento y la aplicación de métodos que auxilien al diagnóstico y comprensión de las infecciones ocultas de los órganos del aparato reproductor, los cuales deberán ser estandarizados y popularizados en aras del fomento de la salud reproductiva y de la salud materno infantil.

Este estudio ha demostrado la utilidad de métodos citomorfológicos de alta resolución para el diagnóstico de la presencia de *Clamidia* y *Mycoplasma* en el líquido seminal, ha contribuido al reconocimiento de la elevada frecuencia de éstas infecciones en pacientes con infertilidad y al entendimiento del impacto que infecciones inespecíficas del tracto reproductor tienen sobre la calidad seminal y espermática.

Con la presente tesis hemos aportado evidencias morfológicas que han contribuido a definir la importancia y los mecanismos de las IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* como gérmenes asociados, cuya participación en secuelas cicatriciales invalidantes para la función reproductora siguen siendo confusas por la dificultad diagnóstica de éstos gérmenes y la poca sintomatología que causan en el varón.

Estudios de co-localización que incluyan marcaje molecular contra las especies más comunes de *Mycoplasma*, incluyendo el *Mycoplasma genitalium*, que en éste trabajo no se consideró, permitirán concluir más precisamente, la utilidad del corte semifino en el diagnóstico de infecciones seminales oculta y mecanismos de patogenicidad implicados.



## **7. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

**PRIMERA.** En asociación con la presencia de Infección Genitourinaria (IGU) los pacientes sub-fértiles que se estudiaron para esta tesis presentaban alteraciones seminales previas en ausencia de signos o síntomas de la infección, que las parejas si refirieron además de antecedentes de pérdidas gestacionales tempranas, obstrucción tubaria y tratamientos de reproducción asistida fallida.

**SEGUNDA.** Se observaron alteraciones del volumen, pH, viscosidad y color del líquido seminal asociados a la IGU de los pacientes que no se vieron en el grupo control, así como teratozoospermia y astenozoospermia. En cambio la concentración y la vitalidad espermática se mantuvieron dentro del rango de valores normales, aunque disminuidas con respecto a los valores registrados en el grupo control.

**TERCERA.** La presencia de bacterias, células de inflamación, restos citoplásmicos, detritus, células epiteliales y fagocitosis espermática fueron hallazgos característicos del grupo de pacientes en el examen citomorfológico del corte semifino.

**CUARTA.** La Inmunofluorescencia Directa (IFD) con anticuerpos anti-*Chlamydia trachomatis* confirmó la naturaleza de las partículas bacterianas descritas como *Chlamydia trachomatis* atendiendo a sus características morfológicas en el 58,75% de los casos. Con los datos obtenidos de esta tesis, y considerando la IFD como estándar de oro, se estableció que el examen citomorfológico en el corte semifino tiene una elevada sensibilidad (96,97%), pero una baja especificidad (37,80%). Queda por resolver la influencia que tiene el grosor del corte semifino en estudios de secciones seriadas y verificar si ocurre daño de la membrana plasmática en la bacteria secundario a la desplastificación. Estudios de co-localización de gérmenes asociados a *Chlamydia trachomatis*, empezando por los *Mycoplasmas*, permitirán concluir con mayor exactitud la utilidad del corte semifino en el diagnóstico de infecciones seminales ocultas.

## **8. RESUMEN**

## RESUMEN

En la presente tesis se describen los antecedentes asociados al diagnóstico microbiológico de Infección Genitourinaria (IGU) por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, en 80 casos de pacientes sub-fértiles que fueron seleccionados para este estudio. La presencia de alteraciones seminales previas que la mayoría de ellos presentaba (79,3%), habían sido consideradas como de etiología desconocida ante la ausencia de signos ó síntomas característicos de algún padecimiento en la mayoría de ellos (71,2%). En cambio, un porcentaje alto de las cónyuges de estos pacientes (90%), presentaban asociados al diagnóstico de IGU *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.*, signos y síntomas de infección con tratamientos previos inespecíficos (74,4%), además de antecedentes de pérdidas gestacionales tempranas (28 pacientes y 37 abortos) y de obstrucción tubaria (17 casos). Las parejas habían sido tratadas sin éxito por inseminaciones intrauterinas (233) y procedimientos de FIV e ICSI (9 procedimientos) de forma infructuosa.

Asociados a la IGU se encontró, en los pacientes incluidos en este estudio, elevación del pH, alteración del volumen y de la viscosidad y color amarillento. Aunque la mayoría de estos cambios no fueron estadísticamente significativos en la comparación de pacientes entre sí y con el grupo control, la elevación del pH seminal se asoció a la IGU por *Chlamydia* y *Mycoplasma* significativamente ( $p=0,002$ ; Fisher).

Los datos obtenidos de la presente tesis, aportan evidencia del deterioro de los patrones de desplazamiento curvilíneo y rectilíneo principalmente y para la suma de estos valores en los casos de pacientes con IGU, por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* que resultaron estadísticamente significativos, cuando se compararon con el grupo control y que pudiéramos relacionar directamente con la infección de espermatozoides: al haber observado en un porcentaje elevado de casos, la presencia de bacterias de morfología compatible con dichos gérmenes, que se encontraron adosados al flagelo y dentro del citoplasma de la pieza media del mismo.

Se registró una diferencia estadísticamente significativa en la concentración, morfología y vitalidad espermática entre el grupo de pacientes y el grupo control, pero las diferencias entre grupos de pacientes de acuerdo al diagnóstico microbiológico no fueron significativas. Se confirmó el patrón de teratozoospermia asociado a proceso infeccioso de la vía seminífera caracterizado por la presencia de espermatozoide de núcleo vacuolado y

decondensado, con pieza media engrosada y doblada, enrollamiento y engrosamiento del flagelo.

Mediante la técnica IFD (inmunofluorescencia directa) con anticuerpos monoclonales contra la MOMP de *Chlamydia trachomatis*, aplicada *in situ* al corte semifino desplastificado, se confirmaron el 58,75 % de los casos en los que se visualizaron partículas bacterianas compatibles con la especie *Chlamydia trachomatis*. Sin embargo, un número grande de partículas de morfología similar no presentó positividad a la reacción de inmunofluorescencia. La comparación de los resultados de ambas técnicas estableció una sensibilidad de 96,97% para el diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* en el corte semifino teñido con azul de toluidina y una especificidad de 37,80%, con un valor predictivo positivo de 28,83% y un valor predictivo negativo de 97,96%. La poca especificidad del diagnóstico basado en la morfología de la *Chlamydia* por análisis en el corte semifino pudiera deberse a varios factores como el grosor del corte o el daño de la membrana plasmática bacteriana en la desplastificación y la presencia de gérmenes de morfología similar, como es el caso de la especie *Mycoplasma* con la que la *Chlamydia trachomatis* se encuentra frecuentemente asociada.

El examen que realizamos en cortes semifinos del centrifugado seminal, a pesar de sus limitaciones en cuanto a la especificidad diagnóstica, en el caso particular de las IGU de varones subfértiles, proporcionó información importante acerca del proceso de infección seminal. Así, en el grupo de pacientes infértiles, a diferencia del grupo control, la presencia de bacterias de morfología compatible con las especies *Chlamydia* y *Mycoplasma* coexistió con cambios característicos de proceso inflamatorio, esfacelo de células epiteliales, presencia de leucocitos y macrófagos con actividad fagocítica contra bacterias y espermatozoides dañados e infectados, autólisis y restos celulares.

Con la presente tesis hemos aportado evidencias morfológicas que han contribuido a definir la importancia y los mecanismos de las IGU por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* como gérmenes asociados, cuya participación en secuelas cicatriciales invalidantes para la función reproductora siguen siendo confusas por la dificultad diagnóstica de éstos gérmenes y la poca sintomatología que causan en el varón.

Estudios de co-localización que incluyan marcaje molecular contra las especies más comunes de *Mycoplasma*, incluyendo el *Mycoplasma genitalium*, que en este trabajo no se consideró, permitirán concluir más precisamente la utilidad del corte semifino en el diagnóstico de infecciones seminales oculta y mecanismos de patogenicidad implicados.

## **9. SUMMARY**

## SUMMARY

This thesis describes the clinical background associated with microbiological diagnosis of genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* in 80 cases of subfertile patients, who were selected for this study. The previous seminal change in 79,3% of them had been considered as of unknown etiology in the absence of signs or symptoms characteristic of a infectious condition. In contrast, 90% of the patients couples, presented genitourinary infections (GUI), associated with the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma sp.* as well as early pregnancy loss history (28 patients and 37 abortions) and tubal obstruction (17 cases). The couples had been treated unsuccessfully for intrauterine inseminations (a total of 233) and 9 of IVF and ICSI procedures.

Associated with the GUI were found high seminal pH, alteration of volume and viscosity and yellowish seminal color. Although most of these changes were not statistically significant when comparing patients with each other and with the control group, seminal pH elevation was associated with Chlamydia and Mycoplasma GUI significantly ( $p = 0.002$ , Fisher). Data from this paper provide evidence of diminishing of curvilinear and rectilinear sperm movement in cases of patients with IGU, *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma sp.* These changes were statistically significant when compared with the control group and could be directly related to the sperm infection. In a high percentage of cases, the presence of bacteria morphologically compatible with these germs, were found attached or within the middle piece of the flagellum. There was a statistically significant difference in concentration, morphology and sperm vitality, between the patient group and the control group, but differences between groups of were not significant. Sperm morphology pattern associated to infectious process was characterized by the presence of sperm decondensed and vacuolated nucleus, with thickened and bent middle piece, coiling and thickening of the flagellum. Through the IFD technique with monoclonal antibodies against *Chlamydia trachomatis* MOMP, applied in situ in semi-thin sections, 58,75% were confirmed cases in which bacterial particles were visualized morphologically compatible with *Chlamydia trachomatis*. However a large number of particles of similar morphology showed no positive immunofluorescence reaction. Comparing the results of both techniques established a sensitivity of 96,97% for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in the semi-thin section toluidine blue stained, and a specificity of 37,80%, positive predictive value of 28,83% and a negative predictive value

97,96%. The low specificity of the diagnosis based on the morphology of Chlamydia by semi-thin sections analysis, could be due to several factors including the thickness of section or bacterial membrane damage due to the epoxiresin extraction. Another explanation may be the presence of bacteria with similar morphology, as is the case of Mycoplasma species with which *Chlamydia trachomatis* is often associated.

Despite its limitations in terms of diagnostic specificity, the study of seminal pellet of subfertile men with GUI, provided important information about the seminal infection process. Thus, in the group of infertile patients, unlike the control group, the presence of bacteria of morphology according with Chlamydia and Mycoplasma species, coexisted with characteristic changes of inflammation, sloughing of epithelial cells, presence of leukocytes and macrophage phagocytic activity against bacteria and damaged and infected sperm, autolysis and cellular debris.

In this thesis we have provided morphological evidence that helped define the importance and mechanisms of the GUI for *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma sp.* as germs associated and their involvement in scarring damage for reproductive function, that remain unclear due to diagnostic difficulty of these germs, and the few symptoms observed in men.

Colocalization studies involving molecular signals against the most common species of Mycoplasma, including *Mycoplasma genitalium*, which in this work was not considered, allow to conclude more precisely, the semi-thin section usefulness in the diagnosis of subclinical infections and seminal pathogenic mechanisms involved.

Despite its limitations in terms of diagnostic specificity, the study of seminal pellet of subfertile men with GUI, provided important information about the seminal infection process. Thus, in the group of infertile patients, unlike the control group, the presence of bacteria of morphology according with Chlamydia and Mycoplasma species, coexisted with characteristic changes of inflammation, sloughing of epithelial cells, presence of leukocytes and macrophage phagocytic activity against bacteria and damaged and infected sperm, autolysis and cellular debris.

In this thesis we have provided morphological evidence that helped define the importance and mechanisms of the GUI for *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma sp.* as germs associated and their involvement in scarring damage for reproductive function, that



remain unclear due to diagnostic difficulty of these germs, and the few symptoms observed in men.

Colocalization studies involving molecular signals against the most common species of *Mycoplasma*, including *Mycoplasma genitalium*, which in this work was not considered, allow to conclude more precisely, the semi-thin section usefulness in the diagnosis of subclinical infections and seminal pathogenic mechanisms involved.

## **10. REFERENCIAS**

- Abdel-Rahman Y, Belland R.** The chlamydial developmental cycle. *Microbiol Rev* 2005;29:949-959.
- Acosta-Cázares B, Ruiz-Maya L, De La Peña J.** Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in low-income rural and suburban populations of Mexico. *Sex Trans Dis* 1996;23:283-288.
- Adamopoulos DA, Deliyannis V.** Seminal plasma magnesium, calcium and inorganic phosphate concentration in normozoospermic and sub-fertile men. *Andrologia* 1983;15:648-654.
- Afzelius BA, Dallai R, Lanzavecchia S, Bellon PL.** Flagellar structure in normal human spermatozoa and in spermatozoa that lack dynein arms. *Tissue Cell* 1995;17:241-247.
- Agarwal A, Allamaneni SR.** Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod BioMed Online* 2004;9:338-347.
- Agarwal A, Prabakaran SA.** Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Ind J Exp Biol* 2005;43:963-974.
- Agarwal A, Said T.** Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 2004;95:503-507.
- Agarwal A, Saleh RA.** Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002;29:817-827.
- Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D.** Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online* 2003;7:65-70.
- Aitken RJ, Baker MA.** Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans. *Hum Reprod* 1995;10:1736-1739.
- Aitken RJ.** Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 1997;3:169-173.
- Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ, Evenson DP, Agarwal A.** Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002;78:319-329.
- Alvarez JG, Storey BT.** Sperm lipid peroxidation: its relation to male infertility. In: Martínez-García F, Regadera J. Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview. Churchill Communications Europe. España, Madrid, 1998. pp361-361.
- Andrade-Rocha FT.** *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Men: Attending for routine semen analysis. *Urol Int* 2003;71:377-381.
- Anttila T, et al.** Chlamydial antibodies and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2005;14:385-389.
- Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Narvanen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L, Paavonen J.** Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA* 2001;285:47-51.
- Audring H, Klug H, Bollmann R, Sokolowska-Köhler W, Engel S.** *Ureaplasma urealyticum* and male infertility: An animal model II. Morphologic changes of testicular tissue at light microscopic level and electron microscopic findings. *Andrologia* 1989;21:66-75.
- Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ.** Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril* 2004;82:621-627.
- Baboonian, C, Smith DA, Shapland D, Arno G, Zal B, Akiyu J, Kaski JC.** Placental infection with *Chlamydia pneumoniae* and intrauterine growth restriction. *Cardiovasc Res* 2003;60:165-169.
- Badalyan RR, Fanarjyan SV, Aghajanyan.** Chlamydial and Ureaplasma infections in patients with nonbacterial chronic prostatitis. *Andrologia* 2003;35:263.
- Baehr W, Zhang Y, Josep T, Su H, Nano FE, Evertt DE, et al.** Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;85:4000-4004.
- Bavoil P.** Invasion and Intracellular Growth of Chlamydia Species. In: Iglewski BH, Clark VL. Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis. Academic Press INC. San Diego, CA, 1990. pp273-296.
- Bell TA, Kuo CC, Stamm WE, Tam MR, Stephens RS, Holmes KK, Grayston JT.** Direct fluorescent monoclonal antibody stain for rapid detection of infant *Chlamydia trachomatis* infections. *Pediatrics* 1984;74:224-228.
- Ben Ali H, Guerin JF, Pinatel MC, Mathieu C, Boulieu D, Tritar B.** Relationship between semen characteristics, alpha-glycosidase and the capacity of spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Int J Androl* 1994;17:121-126.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF.** Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18:1023-1028.
- Benítez AL, Díaz Gutiérrez OG, Eguía RM, Gallegos G.** Seminal phagocytes detection at light-microscopy level using three different

- techniques. In: Bailey GW, Corbett JM, Dimlich RVW, Michael JR, Zaluzac NJ. Microscopy and Microanalysis. San Francisco Press Inc. San Francisco, USA, 1996. pp778-779.
- Berger RE, Alexander ER, Harnisch JP, Paulsen CA, Monda GD, Ansell J, Holmes KK.** Etiology manifestations and therapy of acute epididymitis: Prospective study of 50 cases. *J Urol* 1979;121:750-754.
- Biarc J, Nguaye IS, Pini A, Gossé F, Richert S, Thierse D, Van-Dorsseraer A, Leize-Wagner E, Raul F, Klein JP, Schöller-Guinard M.** Carcinogenic properties of proteins with pro-inflammatory activity from *Streptococcus infantarius* (Formerly *S. bovis*) *Carcinogenesis* 2004;25:1477-1484.
- Bjercke S, Purvis K.** Characteristics of women under fertility investigation with IgA/IgG seropositivity for *Chlamydia trachomatis*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993;51:157-161.
- Black CM, Marrazo J, Jhonson RE, Hook EW, Jones RB3, Green TA, Schachter J, Stam WE, Bolan G, St-Louis ME, Martin DH.** Head to head comparisson of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improve reference standard. *J Clin Microbiol* 2002;40:3757-3763.
- Bosch FX, Lorinez A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV.** The casual relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J ClinPathol* 2002;55:244-265.
- Bragina EY, Gomberg MA, Dmitriev GA.** Electron microscopic evidence of persistent chlamydial infection following treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001;15:405-409.
- Brunham RC, Maclean IW, Binns B, Peeling RW.** *Chlamydia trachomatis*: its role in tubal infertility. *J Infect Dis* 1985;152:1275-1282.
- Brunner H, Weidner W, Schiefer HG.** Quantitative studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* in non-gonococcal urethritis and cronic prostatitis. *Yale J Bio Med* 1983;56:545-550.
- Bucurescu G, Stieritz DD.** Evidence of an association between *Chlamydia pneumoniae* and cerebrovascular accidents. *Eur J Neurol* 2003;10:449-452.
- Bush RM, Everett KD.** Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:203-220.
- Busolo F, Zanchetta R, Bertoloni G.** Mycoplasmic localization patterns on spermatozoa from infertile men. *Fertil Steril* 1984;42:412-417.
- Canto-de Cetina T, Polanco-Reyes L, Fernández-González V, Ruiz-García S.** Infección por *Chlamydia trachomatis* en usuarias de dos clínicas de planificación familiar. *Salud Publica Mex* 2003;45:657-661.
- Carter JD, Espinoza LR, Inman RD, Sneed KB, Ricca LR, Vassey FB, Valeriano L, Stanich JA, Ozust C, Gerard HC, Hudson AP.** Combination antibiotics as a treatment for chronic Chlamydia induced reactive arthritis: a double blind placebo controlled prospective trial. *Arthritis rheum* 2010;62:1298-1307.
- Carter JD, Gerard HC, Hudson AP.** Psoriasiform lesions induced by tumor necrosis factor antagonist: a skin-deep medical conundrum. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1181-1183.
- Carver BS, Bozeman CB, Williams BJ, Venable DD.** The prevalence of men with national institutes of health category IV prostatitis and association with serum prostate specific antigen. *J Urol* 2003;169:597-598.
- Cassel GH, Waites KB, Crouse DT.** Mycoplasmal Infections. In: Infectious diseases of the fetus and Newborn Infant. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000. pp733-767.
- Cassel GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R.** *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:69-87.
- Castle PE, Escoffery C, Schachter J, et al.** *Chlamydia trachomatis*, herpes simplex virus 2, and human T-cell lymphotropic virus type 1, are not associated with grade of cervical neoplasia in Jamaican colposcopy patients. *Sex Transm Dis* 2003;30:575-580.
- Cengiz, T, Aydoganly L, Baykam M, Mungan NA, Tuncbilek E, Dincer M, Yakupoglu K, Akalin Z.** Chlamydial Infections and male infertility. *Int Urol Nephrol* 1997;29:687-693.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** Chlamydia prevalence monitoring project annual report. 2007. Sexually transmitted disease surveillance 2007. (<http://www.cdc.gov/std/chlamydia2007/>)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Assisted Reproductive Technology Success Rates. *Reprod Health Nat Sum Fertil Clin Rep* 2000:1-12.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Recommendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections. Morbid. Mortal. *Weekly Rep* 1993;42:1-39.
- Chan P, Su BC, Tredway DR, Whitney EA, Pang SC, Corselli J, Jacobson JD.** White blood cells in semen affect hyperactivation but not sperm membrane integrity in the head and tail regions. *Fertil Steril* 1994;61:986-989.

- Chan PT, Schlegel PN.** Inflammatory conditions of the male excurrent ductal system. *J Androl* 2002;23:453-460.
- Chang MW, Konishi H, Yoshii Z, Matsuo Y.** Light and electron microscopic studies on the attachment of *Ureaplasma urealyticum* to human leukemia cell. *Hiroshima J Med Sci* 1985;34:455-458.
- Chemes EH, Rawe VY.** Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003;9:405-428.
- Chemes HE, Olmedo SB, Carrera C, Osés R, Carizza C, Leisner M, Blaquier J.** Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod* 1998;13:2521-2526.
- Chernesky MA, Mohony JB, Castriciano S, Mores M, Stewart IO, Landis SJ, Seidelman W, Sargeant EJ, Leman C.** Detection of *Chlamydia trachomatis* antigens by enzyme immunoassay and immuno fluorescence in genital specimens from symptomatic and asymptomatic men and women. *J Infect Dis* 1986;154:141-148.
- Claman P, Amimi MN, Peeling RW, Toye B, Jessamine P.** Does serologic evidence of remote *Chlamydia trachomatis* infection and its heat shock protein (CHSP 60) affect in vitro fertilization-embryo transfer outcome? *Fertil Steril* 1996;65:146-149.
- Clarke GN, Elliott PJ, Smaila C.** Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985;7:118-123.
- Clausen HF, Fedder J, Drasbek M, Nielsen PK, Toft B, Ingerslev HJ, Birkelund S, Christiansen G.** Serological investigation of *Mycoplasma genitalium* in infertile women. *Hum Reprod* 2001;16:1866-1874.
- Clifton DR, Fields KA, Grieshaber SS, Dooley CA, Fisher ER, Mead DJ, Carabeo RA, Hackstadt T.** A Chlamydial type III translocated protein is Tyrosine phosphorylated at the site of entry and associated to recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:10166-10171.
- Cocchiari JL, Valdivia RH.** New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. *Cellular Microbiology* 2009;11:1571-1578.
- Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ.** Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Rep Update* 1998;4:73-82.
- Colpi GM, Negri L, Piffaretti-Yannez A, Balerna M.** Inflammatory pathology of the genital tract and male infertility. A short review. *Acta Eur Fertil* 1989;20:125-132.
- Comhaire FH, Vermeulen L, Pieters O.** Study of the accuracy of physical and biochemical markers in semen to detect infectious dysfunction of the accessory sex glands. *J Androl* 1989;10:50-53.
- Corinne de Vantery A, Herve L, Didier CH, Ariane de A.** Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:1-12.
- Cottell E, Lennon B, Mc Morow J, Barry-Kinsella C, Harrison RF.** Processing of semen in an antibiotic-rich culture medium to minimize microbial presence during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1997;67:98-103.
- Courtade M, Lagorce C, Bujan L, Caratero C, Mieuxet R.** Clinical Characteristics and light and transmission electron microscopic sperm defects of infertile men with persistent unexplained asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1998;70:297-304.
- Cravioto MC, Matamoros O, Villalobos-Zapata Y, Peña O, García-Lara E, Martínez M, Castelo J, Sifuentes-Osornio J.** Prevalencia de anticuerpos anti-*Chlamydia trachomatis* y anti-*Neisseria gonorrhoeae* en grupos de individuos de la población mexicana. *Salud Publica de México* 2003;45:681-689.
- Creighton S, Tenant-Flowers M, Taylor CB, Miller R and Low N** Co-infection with gonorrhoea and chlamydia: how much is there and what does it mean? *Int J STD AIDS* 2003;14:109-11.
- Cunningham KA, Beagley KW.** Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. *Biol Repro* 2008;79:180-189.
- Davis CH, Raulston JE, Wyrick PB.** Protein disulfide isomerase, a component of estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells. *Infect Immun* 2002;70:3413-3418.
- De Borges RJ, Carvallo I.** Ultraestructura de Chlamydia en células descamadas del cuello. *IDEA* 1987;25:257-264.
- De Louvois J, Belder M, Harrison RF, Hurley R, Stanley VC.** Frequency of Mycoplasma in fertile and infertile couples. *Lancet* 1974;1:1073-1075.
- De Silva NS, Quinn PA.** Localization of endogenous activity of phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum*. *J Clin Microbiol* 1991;29:1498-1503.

- Dean D, Suchland RJ, Stamm WE. Evidence for long-term cervical persistence of *Chlamydia trachomatis* by omp1 genotyping. *J Infect Dis* 2000;182:909-916.
- De-Barbeyrac B, Papaxanthos-Roche A, Mathieu C, Germain C, Brun JL, Gachet M, Mayer G, Beaber C, Chene G, Hocke C. *Chlamydia trachomatis* in subfertility couples undergoing an in vitro fertilization program: a prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;129:46-53.
- Del Giudice L, Wolf K, Sassone-Corsi P, Mazza A. 2 gm covalently closed non-mitochondrial circular DNA in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 1979;172:165-169.
- Delavierre D. Orchi-epididymitis. *Ann urol* 2003;37:322-38.
- Dennis LM, Lynch CF, Torner JC. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urol* 2002;60:78.
- Depuydt CE, Bosmans E, Zalata A, Schoonjans F, Comhaire FH. The relation between reactive oxygen species and cytokines in andrological patients with or without male accessory gland infection. *J Androl* 1996;17:699-707.
- Díaz OG. Estudio de la Ultraestructura Seminal y de los parámetros seminológicos, en pacientes infértiles con PCR positivo para *Ureaplasma urealyticum*. Monterrey, Mexico. 1999 Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.
- Díaz-Gutiérrez OG, Gallegos AG. *Ureaplasma urealyticum* diagnosis by PCR in infertile men and its clinical relevance. *J Androl* 1999;20:38.
- Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function. *Curr Opin Urol* 2000;10:39-44.
- Diemer T, Weidner W, Michelmann HW, Schiefer HG, Rován E, Mayer F. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *Int J Androl* 1996;19:271-277.
- Dille BJ, Butzen CC, Birkenmeyer LG. Amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:729-731.
- Dillner J, Lehtinen M, Bjorge T, et al. Prospective seroepidemiologic study of human papillomavirus infection as a risk factor of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1293-1299.
- Diquelou JY, Pastorini E, Feneux D, Gicquel JM. The role of *Chlamydia trachomatis* in producing abnormal movements by spermatozoa. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1989;18:615-625.
- Diquelou JY, Pia P, Tesquier L, Henry-Suchet J, Gicquel JM, Boyer S. The role of *Chlamydia trachomatis* in the infectious etiology of extra-uterine pregnancy. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1988;17:325-232.
- Dohle GR. Inflammatory-associated obstructions of the male reproductive tract. *Andrologia* 2003;35:321.
- Dondero F, Lombardo F, Gandini L, Lenzi A. Immunological factors in couple infertility. In: Martínez-García F, Regadera J. Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview. Churchill Communications Europe. Madrid, España, 1998. pp383-392.
- Dong ZW, Li Y, Zhang LY, Liu RM. Detection of *Chlamydia trachomatis* intrauterine infection using polymerase chain reaction on chorionic villi. *Int J Gynaecol Obstet* 1998;61:29-32.
- Dukers-Muijters NH, Niekamp AM, Browers EE, Hoebe CJ. Older and swinging; need to identify hidden and emerging risk groups at STI clinics. *Sex Transm Infect* 2010;86:315-317.
- Eggert-Kruse W, Probst S, Rohr G, Tilgen W, Runnebaum B. Induction of immunoresponse by subclinical male genital tract infection? *Fertil Steril* 1996;65:1202-1209.
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Kunt B, Meyer A, Wondra J, Strowitzki T, Petzoldt D. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in subfertile couples. *Fertil Steril* 2003;80:660-663.
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Probst S, Rusu R, Hund M, Demirakca T, Aufenanger J, Runnebaum B, Petzoldt D. Antisperm antibodies and microorganisms in genital secretions a clinically significant relationship? *Andrologia* 1998;30:61-71.
- Eikman MR, Leinonen M, Sirjälä H, Linnanmäki E, Kujala P, Saikku P. Evaluation of serological methods in the diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* during an epidemic in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:756-760.
- Eley A, Hosseinzadeh S, Hakimi H, Pacey AA. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. *Hum Reprod* 2005;20:2601-2607.
- El-Mulla KF, Kohn FM, Dandal M, El Beheiry AH, Schiefer HG, Weidner W, Schill WB. In vitro effect of *Escherichia coli* on human sperm acrosome reaction. *Arch Androl* 1996;37:73-87.
- Enrique-Laval R. La enfermedad de las cotorras infecciosas. *Rev Chil Infect* 2003;20:37-38.
- Erbengi T. Ultrastructural observations on the entry of *Chlamydia trachomatis* into human spermatozoa. *Hum Reprod* 1993;8:416-421.

- Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of parachlamydiaceae fam. No. and Simkaniaceae family, including a new genus and five new species, and standards for identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:415-440.
- Fagundo R. Chlamydia. Actualización de entidades patológicas y pruebas diagnósticas. *Rev Mex Patol Clin* 2000;47:242-244
- Fenollar F, Gauduchon V, Casaita JP, Lepidi H, Vandenesch F, Raoult D. Mycoplasma endocarditis: Two case reports and a review. *Clin Infect Dis* 2004;38:21-24.
- Fenton KA. Screening men for *Chlamydia trachomatis* infection: have we fully explored the possibilities? *Commun Dis Public Health* 2000;3:86-89.
- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
- Forbes BA, Bartholoma N, McMillan J, Roefaro MA, Weiner L, Welych L. Evaluation of a monoclonal antibody test to detect *Chlamydia* in cervical and urethral specimens. *J Clin Microbiol* 1986;23:1136-1137.
- Fowlkes DM, Dooher GB, O'Leary WM. Evidence of scanning electron microscopy for an association between spermatozoa and T-Mycoplasmas in men of infertile marriage. *Fertil Steril* 1975;26:1203-1211.
- Fowlkes DM, MacLeod J, O'Leary WM. T-Mycoplasmas and human infertility: correlation of infection with alterations in seminal parameters. *Fertil Steril* 1975;26: 1212-1218.
- Furuya R, Takahashi S, Furuya S, Kunishima Y, Takeyama K, Tsukamoto T. Is seminal vesiculitis a discrete disease entity? Clinical and microbiological study of seminal vesiculitis in patients with acute epididimitis. *J Urol* 2004;171:1550-1553.
- Gallegos G, Díaz-Gutiérrez OG, Vázquez MJ, Rositas MR, Ramírez BE. Seminal cytology in infertile men with *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* infections. Observation through electron microscopy. In: Bailey GW, Corbett JM, Dimlich RVW, Michael JR, Zalvuzac NJ. Microscopy and Microanalysis. San Francisco Press Inc. San Francisco, USA, 1996. pp774-775.
- Gallegos G, Ramírez E. Subcelular sperm pathology in the infertile couple: An ultrastructural study. *J Androl* 1994a;15:55-56.
- Gallegos G, Ramos B, Cruz GR. Utilidad del examen citológico en fresco para la detección de proceso inflamatorio asociado a la presencia de *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* *Enferm Infec y Microbiol* 2002;22:98.
- Gallegos G, Rositas-Martínez RE, Díaz-Gutiérrez OG. *Mycoplasma* detection by electron microscopy in semen of infertile patients. *J Androl* 1998;19:56.
- Gallegos G, Villarreal P. Estructura fina del espermatozoide en pacientes con varicocele y falla reproductora. *Med Reprod* 1998;1:7-13.
- Gallegos-Avila G, Alvarez-Cuevas S, Niderhauser-García A, Ancer-Rodríguez J, Jaramillo-Rangel G, Ortega-Martínez M. Phagocytosis of spermatozoa and leukocytes by epithelial cells of the genital tract in infertile men infected with *Chlamydia trachomatis* and mycoplasmas. *Histopathology* 2009a;55:232-234
- Gallegos-Avila G, Ancer-Rodríguez J, Alvarez-Cuevas S, Ramos-Gonzalez B, Sanchez-Hernandez J, Nistal M, Regadera-Gonzalez J. Relevancy of semithin sections on the analysis of seminal damage, due to infection by *Chlamydia* and *Mycoplasma*, in couples with unsuccessful assisted reproduction. Ed. Medimont International. Bologna, Italy, 2009b. pp123-128.
- Gallegos-Avila G, Ancer-Rodríguez J, Alvarez-Cuevas S, Ramos-Gonzalez B, Sanchez-Hernandez J, Nistal M, Regadera-Gonzalez J. Relevancy of semithin sections on the analysis of seminal damage due to infection by *Chlamydia* and *Mycoplasma* in couples with unsuccessful assisted reproduction. Papers contributed to the 9<sup>th</sup> International Congress of Andrology. Eds. J.L. Ballesca and R. Oliva Virgili. Ed. Medimont International, 2009c. pp123-128.
- Gallegos-Avila G, Ancer-Rodríguez J, Ortega-Martínez M, Jaramillo-Rangel G. Infection and phagocytosis: analysis in semen with transmission electron microscopy. Microscopy book series. Edited by A. Méndez-Vilas L. Labajos-Broncano. 2010.
- Gallegos-Ávila G, Chávez-Briones L, Ortiz-Rodríguez C, Ramos-González B, Ancer-Rodríguez J, Álvarez-Cuevas S, Sánchez-Hernández JJ. *Chlamydia trachomatis* is present most frequently in carcinomatous nodules of the prostate than prostatic hyperplasia and healthy prostatic tissue. Abstracts book of presentations. ISSN: 0196-36-35. 9th International Congress of Andrology. American Society of Andrology. 2009d. p125
- Gallegos-Avila G, Ramos-González B, Santiso R, Goyanes V, Fernández JL. Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma sp.* *Fertility Sterility* 2008a;90:328-334.

- Gallegos-Avila G, Ramos-González B, Santiso R, Goyanes V, Gosalvez J, Fernandez JL.** Infertility due to *C. trachomatis* and *Mycoplasma* is a result of sperm DNA fragmentation. *Nature Reviews Urology* 2008b;5:580.
- Gallegos-Avila G.** An Integrate Approach to Understand Infertility Infectious Factor. Supported By High Resolution Morphological studies of seminal fluid. In: XXI International Symposium on Morphological Sciences. Abstract Book. Messina, Italia. Edited & Printed by Departament of Biomorphology and Biotechnologies 2010. pp28.
- Gallegos-Ávila MG.** Estudio citológico del semen de hombres subfértiles con infección genital por *Chlamydia* y *Mycoplasma*. Observaciones en cortes semifinos y ultrafinos. Doctor en Medicina, Madrid, Universidad Autónoma de Madrid, 2005. pp160.
- Garcia H, Pérezares J, Castrijon L, Aceves P, Lobato E.** El tracoma. *AMSE* 2008; 21:1-7
- Gattuccio F, Di Trapani D, Romano C, Turtulici B, Milici M, Pavone C, D'Alia O, Alaimo R, Latteri MA.** Urogenital inflammations: aetiology diagnosis and their correlation with varicocele and male infertility. *Acta Eur Fétil* 1988;19:201-208.
- Gaudoin M, Rekha P, Morris A, Lynch J, Acharya U.** Bacterial vaginosis and past chlamydial infection are strongly and independently associated with tubal infertility but do not affect *in vitro* fertilization success rates. *Fertil Steril* 1999;72:730-732.
- Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, Chakroun N, Sallemi A, Znazen A, Rebai T, Hammami A.** Assessment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in semen and first-void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J Androl* 2007;29:198-206.
- Geisler WM, Wang C, Morrison SG, Black CM, Bandea CI, Hook EW.** The natural History of untreated *Chlamydia trachomatis* infection in the interval between screening and returning for treatment. *Sex Transm Dis* 2008;35:119-123.
- Gerard HC, Freise J, Wang Z.** *Chlamydia trachomatis* genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs persistent infection. *Microbes Infection* 2002;4:13-22.
- Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, Berkley SF, Piot P.** Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. *Sex Transm Infect* 1998;74:512-516.
- Gerstenbluth RE, Seftel AD, MacLennan GT, Rao RN, Corty EW, Ferguson K, Resnick MI.** Distribution of chronic prostatitis in radical prostatectomy specimens with up-regulation of bel-2 in areas of inflammation. *J Urol* 2002;167:2267-2270.
- Gnarpe H, Friberg J.** *Mycoplasma* and human reproductive failure. The occurrence of different *Mycoplasma* in couples with reproductive failure. *Am J Obstet Gynecol* 1972;114:727-731.
- Gnarpe H, Friberg J.** T-mycoplasmas on spermatozoa and infertility. *Nature* 1973;245:97-98.
- Gonzales CF, Kortebani G, Mazzolli AB.** Hyperviscosity and hypofunction of the seminal vesicles. *Arch Androl* 1993;30:63-68
- Gonzales CF, Kortebani G, Mazzolli AB.** Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil Steril* 1992;57:1058-1065
- González GF, Muñoz G, Sánchez R, Henkel R, Gallegos-Avila G, Díaz-Gutiérrez O, Vigil P, Vázquez F, Kortebani G, Mazzolli A, Bustos-Obregón E.** Update on the impact of *Chlamydia trachomatis* infection on male fertility. *Andrologia* 2004;36:1-23.
- Gordon FB, Harper IA, Quan IA, Treharne JD, Dwyer RS, Garland JA.** Detection of *Chlamydia* (Bedsonia) in certain infections in man. Laboratory procedures; comparisons of yolk sac and cell culture for detection and isolation. *J Infect Dis* 1969;120:451-462.
- Gorga, F. Galdiero, M. Buommino, E. Galdiero, E.** Porins and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;206-208.
- Greendale GA, Haas ST, Holbrook K, Walsh B, Schachter J, Phillips RS.** The relationship of *Chlamydia trachomatis* infection and male infertility. *Am J Public Health* 1993;83:996-1001.
- Gregoriou O, Botsis D, Papadias K, Kassanos D, Liapis A, Zourlas PA.** Culture of seminal fluid in infertile men and relationship to semen evaluation. *Int J Gynecol Obstet* 1988;28:149-153.
- Habermann B, Krause W.** Altered sperm function or sperm antibodies are not associated with chlamydial antibodies in infertile men with leukocytospermia. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999;12:25-29.
- Halberstädter LPS.** Über Zellein schulsse parasiträrer Natur beim trachom. *Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gessundhsamte* 1907;26:44-47.
- Hales DB, Diemer T, Hales KH.** Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* 1999;10:201-217.



- Hargreave TB, Harvey J, Elton RA, McMillan A.** Serum agglutinating and immobilising sperm antibodies in men attending a sexually transmitted disease clinic. *Andrologia* 1984;16:111-115.
- Henkel R, Schill WB.** Sperm separation in patients with urogenital infection. *Andrologia* 1998;30:91-97.
- Hernández JT, Alonso H, Deleón I, Jiménez Z, Escamilla E, Fainzilber Z, García S.** Investigación de *Chlamydia trachomatis* utilizando tres técnicas. *Bioquímica* 1992;17:28-32.
- Herring AJ.** Typing *Chlamydia psittaci*: a review of methods and recent findings. *Br Vet J* 1993;149:455-475.
- Hicks D.** Complication of *Chlamydia trachomatis* infection in men, In: Moss TR. International handbook of Chlamydia 3rd edn. Alden Press. Halsemere, UK, 2008 pp99-109.
- Hill JA, Cohen J, Anderson DJ.** The effects of lymphokines and monokines on sperm fertilizing ability in the zone-free hamster egg penetration test. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1154-1159.
- Hinting A, Soebadi DM, Santoso RI.** Evaluation of the immunological cause of male infertility. *Andrologia* 1996;28:123-126.
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M.** Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrin* 2003;1:107.
- Hosseinzadeh S, Brewis IA, Eley A, Pacey AA.** Co-incubation of human spermatozoa with *Chlamydia trachomatis* serovar E causes premature sperm death. *Hum Reprod* 2001;16:293-299.
- Hosseinzadeh S, Brewis IA, Pacey AA, Moore HDM, Eley A.** Coincubation of human spermatozoa with *Chlamydia trachomatis* in vitro causes increased tyrosine phosphorylation of sperm proteins. *Infect Immun* 2000;68:4872-4876.
- Howell MR, Quinn TC, Brathwaite W, Gaydos CA.** Screening women for *Chlamydia trachomatis* in family planning clinics: the cost-effectiveness of DNA amplification assays. *Sex Transm Dis* 1998;25:108-117.
- Hua VN, Schaeffer J.** Acute and chronic prostatitis. *Urol Clin North Am* 2004;88:483-494.
- Huwe P, Diemer T, Ludwing M, Lui J, Schiefer HG, Weidner W.** Influence of different uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters in an *in vitro* experiment. *Andrologia* 1998;30:55-59.
- Jakiel G, Robak-Cholubek D, Wieczorek P, Bokinić M.** Evaluation of some parameters of human semen with positive chlamydial reaction. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska* 2004;59:61-64.
- Joyner JL, Douglas JM, Foster Jr M, Judson FN.** Persistence of *Chlamydia trachomatis* infection detected by polymerase chain reaction in untreated patients. *Sex Transm Dis* 2002;29:196-200.
- Jungwirth A, Straberger A, Esterbauer B, Fink K, Schmeller N.** Acrosome reaction in *Chlamydia*-positive and negative patients. *Andrologia* 2003;35:314-316.
- Kadar A, Bucsek M, Kardos M, Corradi G.** Detection of *Chlamydia trachomatis* in chronic prostatitis by *in situ* hybridization. *Orv Hetil* 1995;136:659-662.
- Keane FEA, Thomas BJ, Gilroy CB, Renton A, Taylor-Robinson D.** The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observation on heterosexual women and their male partners. *Int J STD AIDS* 2000;11:356-360.
- Keck C, Gerber-Schäfer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M.** Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 1998;4:891-903.
- Khan MA, Potter CW, Sharrard RM.** A reverse transcriptase-PCR based assay for in-vitro antibiotic susceptibility testing of *Chlamydia pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 1996;37:677-685.
- Kinnunen A, Surcel HM, Halttunen M, Tiitinen A, Morrison RP, Morrisson SG, Koskella P, Lehtinen M, Paavonen J.** *Chlamydia trachomatis* head shock protein-60 induced interferon gamma and interleukin-10 production in infertile women. *Clin Exp Immunol* 2003;131:199-303.
- Kjaergaard N, Kristensen B, Hansen ES, Farholt S, Schonheyder HC, Uldbjerg N, Madsen H.** Microbiology of semen specimens from males attending a fertility clinic. *APMIS* 1997;105:566-570.
- Knox CL, Allan JA, Allan JM, Edirisinghe WR, Stenzel D, Lawrence FA, Purdie DM, Timms P.** *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* are detected in semen after washing before assisted reproductive technology procedures. *Fertil Steril* 2003;80:921-929.
- Köhn FM, Erdmann I, Oeda T, El Mulla KF, Schiefer HG, Schill WB.** Influence of urogenital infections on sperm functions. *Andrologia* 1998;30:73-80.
- Kojima H, Wang SP, Kuo CC, Grayston JT.** Local antibody in semen for rapid diagnosis of *Chlamydia trachomatis* epididymitis. *J Urol* 1988;140:528-531.

- Koskela P, Anttila T, Bjorge T, *et al.* *Chlamydia trachomatis* infection as a risk factor for invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2000;85:35-39.
- Koumantakis I, Matalliotakis I, Kyriakou D, Fragouli Y, Relakis K. Increased levels of interleukin-8 in human seminal plasma. *Andrologia* 1998;30:339-343.
- Kouri V, Cartaya J, Rodríguez ME, Muné M, Soto Y, Resik S, Bravo J, Llop A. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in human immunodeficiency virus-infected women in Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:1073-1077.
- Krause W, Bohring C, Gueth A, Horster S, Krisp A, Skrzypek J. Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation. *Andrologia* 2003;35:279.
- Krause W. Male accessory gland infection. *Andrologia* 2008;40:113-116.
- Krech T, Bleckmann M, Paatz R. Comparison of Buffalo Green Monkey cells and McCoy cells for isolation of *Chlamydia trachomatis* in a microtiter system. *J Clin Microbiol* 1989;27:2364-2365.
- Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 4. 2nd ed. Atlanta, GA: Springer, 2010.
- Krieger JN. Epididymitis, orchitis and related conditions. *Sex Transm Dis* 1984;11:173-181.
- Kundsins RB. Mycoplasmas in humans: significance of *Ureaplasma urealyticum*. *Health Lab Sci* 1976;13:144-151.
- Kuo C, Wang S, Wentworth B, Grayston JT. Primary isolation of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE-dextran. *J Infect Dis* 1972;125:665-668.
- Kuo CC, Wang SP, Holmes KK, Grayston JT. Immunotypes of *Chlamydia trachomatis* isolated in Seattle, Washington. *Infect Immun.* 1983;41:865-868.
- Kurpisz M, Alexander NJ. Carbohydrate moieties on sperm surface: physiological relevance. *Fertil Steril* 1995;63:158-165.
- Law H, Itkonen O, Lingwood CA. The sulfogalactolipid binding protein SLIP 1: a conserved function for a conserved protein. *J Cell Physiol* 1988;137:462-468.
- Levy R, Layani-Milon MP, Giscard D'Estaing S, Najioullah F, Lornage J, Aymard M, Lina B. Screening for *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* infection in semen from asymptomatic male partners of infertile couples prior to *in vitro* fertilization. *Int J Androl* 1999;22:113-118.
- Lewis-Jones I, Aziz N, Seshadri S, Douglas A, Howard P. Sperm chromosomal abnormalities are linked to sperm morphologic deformities. *Fertil Steril* 2003;79:212-215.
- Licciardi F, Grifo JA, Rosenwaks Z, Witkin SS. Relation between antibodies to *Chlamydia trachomatis* and spontaneous abortion following *in vitro* fertilization. *J Assist Reprod Genet* 1992;9:207-210.
- Lindner LE, Geerling S, Nettum JA, Miller SL, Altman KH, Wechter SR. Identification of *Chlamydia* in cervical smears by immunofluorescence: Technic, sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol* 1986;85:180-185.
- Lingwood CA, Queen PA, Wilansky S, Nutikka A, Ruhnke HL, Miller RB. Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility. *Biol Reprod* 1990;43:694-697.
- Littman AJ, *et al.* *Chlamydia pneumoniae* infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1624-1630.
- Liu JH, Li HY, Cao ZG, Duan YF, Li Y, Ye ZQ. Influence of several uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters *in vitro*. *Asian J Androl* 2002;4:179-182.
- Liu RZ, Gao JC, Zhang HG, Wang RX, Zhang ZH, Liu XY. Seminal plasma zinc level may be associated with the effect of cigarette smoking on sperm parameters. *J Ind Med Res* 2010;38:923-928.
- Liversedge NH, Jenkins JM, Keay SD, McLaughlin EA, Al-Sufyan H, Maile LA, Joels LA, Hull MG. Antibiotic treatment based on seminal cultures from asymptomatic male partners in *in-vitro* fertilization is unnecessary and may be detrimental. *Hum Reprod* 1996;11:1227-1231.
- Lombardo F, Gandini L, Alfaro P, Anticoli-Borza L, Fabbri G, Lenzi A. Male genitourinary tract infection caused by *Chlamydia trachomatis* and seminal characteristics use of minocycline. *Arch Ital Urol Nefrol Androl* 1990;62:47-53.
- Lu H, Shen C, Brunham RC. *Chlamydia trachomatis* infection of epithelial cells induces the activation of caspase-1 and release of mature IL-18. *J Immunol* 2000;165:1463-1469.
- Luostarinen T, Lehtinen M, Bjorge T, Abeler V, Hakama M, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Lenner P, Lie AK, Paavonen J, Pukkala E, Saikku P, Sigstad E, Thoresen S, Youngman LD, Dillner J, Hakulinen. Joint effects of different human papilloma viruses and *Chlamydia trachomatis* infections on risk of squamous cell

- carcinoma of the cervix uteri. *Eur J Cancer* 2004;40:1058-1065.
- Maciejewski Z, Dziecielski H, Swierczynski W, Semmler G.** Morphological semen changes in *Chlamydia trachomatis* infections. *Ginek Pol* 1989;60:314-317.
- Magon T, Kluz S, Chrusciel A, Obrzut B, Skret A.** The PCR assessed prevalence of *Chlamydia trachomatis* in aborted tissues. *Med Wieku Rozwoj* 2005;9:43-48.
- Mahilum-Tapay L, Laitila V, Wawryniak JJ, Lee HH, Alexander S, Ison C, Swain A, Barber P, Ushiro-Lumb I, Goh BT.** New point of care *Chlamydia* rapid test. Bridging the gap between diagnosis and treatment: performance evaluation study. *BMJ* 2007;335:1190-1194.
- Mandell D.** Bennett's. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York, Churchill Livingstone. 1994; Vol.1 and 2: pp2804
- Mandell G L.** Enfermedades Infecciosas. Tomo II. Ed. Médica Panamericana. Bs. Aires, Rep. Argentina, 1991. p1519.
- Mardh PA.** Influence of infection with *Chlamydia trachomatis* on pregnancy outcome, infant health and life-long sequelae in infected offspring. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16:847-864.
- Martínez M.** Microbiological diagnosis of *Chlamydia trachomatis*: state of the problem. *Rev Chil Infectol* 2001;18:275-284.
- Martínez T.** Microbiological diagnosis of sexually transmitted infections (STI). Non-viral STI *Rev Chil Infectol* 2009;26:529-539.
- McCormack WM, Alpert S, McComb DE, Nichols RL, Semine DZ, Zinner ZH.** Fifteen-month follow-up study of women infected with *Chlamydia trachomatis*. *N Engl J Med* 1979; 300:123-125.
- McDonagh S, Maidji E, Ma W, Chang HT, Fisher S, Pereira L.** Viral and bacterial pathogens at the maternal-fetal interface. *J Infect Dis* 2004;190:826-834.
- McGregor JA, French JL.** Preterm Birth: The Role of Infection and Inflammation. *Medscape Womens Health* 1997;8:1-5.
- Menkveld R, Holleboom C, Rhemrev J.** Measurement and significance of sperm morphology. *Asian J Androl* 2011;13:59-68.
- Menkveld R, Kruger TF.** Sperm morphology and male urogenital infection. *Andrologia* 1998;30:49-53.
- Michelmann HW.** Influence of bacteria and leukocytes on the outcome of *in vitro* fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Andrologia* 1998;30:99-101.
- Micic S, Petrovic S, Dotlic R.** Seminal antisperm antibodies and genitourinary infection. *Fertil Steril* 1990;35:54-56.
- Milingos S, Comhaire FH, Liapi A, Aravantinos D.** The value of semen characteristics and test of sperm function in selecting couples for intra-uterine insemination. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;64:115-118.
- Modarress KJ, Cullen AP, Jafurrs WJ, Trotman GL, Moussavi N, Hubbard RA, Henderson S, Loricz AT.** Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoea* in swab specimens by the Hybrid Capture II and PACE2, nucleic acid probe test. *Sex Transm Dis* 1999;303-308.
- Molano MC, Meijer J, Weiderpass E, Arslan A, Posso H, Franceschi S, Ronderos M, Munoz M, Van den Brule J.** The natural course of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic Colombian women: a 5-year follow-up study. *J Infect Dis* 2005;191:907-916.
- Moller BR.** Demonstration of Chlamydial inclusions in exfoliated cells. *Scand J Infect Dis* 1982;32:16-20.
- Monavi, K.** A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006;20:941-951.
- Morales R, Lledó B, Ortiz José A, Rodríguez-Arnedo Doril, Fabregat A, Bernabeu R.** Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de fertilidad* 2007;24:305-313.
- Morré SA, Moes R, van Valkengoed I, Boeke JP, van Eijk JTM, Meijer CJ, Van den Brule AJ.** Genotyping of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens will facilitate large epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3077-3078.
- Morre SA, Van den Brule AJ, Rozendaal L, Boeke AJ, Voorhorst FJ, De Blok S, Meijer CJ.** The natural course of asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections: 45% clearance and no development of clinical PID after one-year follow-up. *Int J STD AIDS* 2002;13:12-18
- Moskowitz MO, Mellinger BC.** Sexually transmitted diseases and their relation to male infertility. *Urol Clin North Am* 1992;19:35-45.
- Moulder JW.** Interaction of Chlamydia and host test *in vitro*. *Microbiol Rev* 1991;55:143-190.
- Munuce MJ, Bregni C, Carizza C, Mendeluk G.** Semen culture, leukocytospermia, and the presence of sperm antibodies in seminal hyperviscosity. *Arch Androl* 1999;42:21-28.
- Naaheimo H, Kosma P, Brade L, Brade H, Peters I.** Mapping the binding of synthetic

- disaccharides representing epitopes of Chlamydial lipopolysaccharide to antibodies with NMR. *Biochem* 1999;89:3240-3248.
- Nagler, HM.** Infertilidad Masculina: Conceptos y controversias actuales. Clínicas Urológicas de Norteamérica. Elsevier Masson. España, 2008. pp35.
- Ness RB, Markovic N, Carlson CL, Coughlin MT.** Do men become infertile after having sexually transmitted urethritis? An epidemiologic examination. *Fertil Steril* 1997;68:205-213.
- Newhall WJ, Johnson RE, DeLisle S, Fine D, Hadgu A, Matsuda B, Osmond D, Campbell J, Stamm WE.** Head-to-head evaluation of five Chlamydia tests relative to a quality-assured culture standard. *J of Clin Microbiol* 1999;37:681-685
- Nistal M, Jiménez-Hefferman A, Mate A.** Non-neoplastic pathology of the human rete testis. In: Martínez-García F, Regadera J. Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview. Churchill Communications Europe. Madrid, España, 1998. pp277-292.
- Norman J.** Epidemiology of female genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16:775-787.
- Numazaki K, Asanuma H.** Liver dysfunction due to cytomegalovirus associated with *Chlamydia trachomatis* and respiratory syncytial virus infections. *Clin Microbiol* 2004;26:11.
- Núñez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martínez-Ferrer M, Meseguer MA.** *Ureaplasma urealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13:2756-2761.
- Núñez-Troconis JT.** *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in different gynecologic diseases. *Invest Clin* 1999;40:9-24.
- Obasi AI, Rebecca Balira, Todd J, Ross DA, Changalucha J, Mosha F, Grosskurth H, Peeling R, Mabey DCW, Hayes RJ.** Prevalence of HIV and *Chlamydia trachomatis* infection in 15-19 year olds in rural Tanzania. *Trop Med Int Health* 2001;6:517-525.
- Ochsendorf FR, Ozdemir K, Rabenau H, Fenner T, Oremek R, Milbradt R, Doerr HW.** *Chlamydia trachomatis* and male infertility: chlamydia-IgA antibodies in seminal plasma are *C. Trachomatis* specific and associated with an inflammatory response. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999;12:143-152.
- Ochsendorf FR.** Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia* 2008;40:72-75.
- Ojeda-Sahagún JL** Métodos de microscopia electrónica de barrido en biología. Universidad de Catabria, Santander, 1997 pp269.
- Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C.** El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec* 2006;19:426-436.
- Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ, Alvarez JG.** Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implication in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001;16:1912-1921.
- Oriel JD, Reeve P, Powis P, Miller A, Nicol CS.** Isolation of Chlamydia from patients with non-specific genital infection. *British Journal of Venereal Diseases* 1972;48:429-436.
- Ossewaarde JM, Riefe M, Vries A, Derksen-Nawrocki RP, Hooft HJ, Van-Doornum GJ, Van-Loon AM.** Comparisson of two panels of monoclonal antibodies for determination of *Chlamydia trachomatis* serovars. *J Clin Microbiol* 1994;32:2968-2974.
- Ostaszewska I, Zdrodowska-Stefanow B, Badyda J, Pucilo K, Trybula J, Bulhak V.** *Chlamydia trachomatis*: probable cause of prostatitis. *Int J STD AIDS* 1998;9:350-353.
- Paavonen J, Eggert-Kruse W.** *Chlamydia trachomatis*: impact of human reproduction. *Hum Reprod Update* 1999;5:433-447.
- Paavonen J, Wolner-Hanssen P.** *Chlamydia trachomatis*: a major treat to reproduction. *Hum Reprod* 1989;4:111-124.
- Palayekar VV, Joshi JV, Hazari KT, Shah RS, Chitlange SM.** Comparison of four non culture dignostic test for *Chlamydia trachomatis* infection. *J Assoc Physicians India* 2000;48:481-483.
- Pannekoek Y, Westenberg SM, Eijk PP, Repping S, van der Veen F, van der Ende A, Dankert J.** Assessment of *Chlamydia trachomatis* infection of semen specimens by ligase chain reaction *J Med Microbiol* 2003; 52:777-779.
- Parks, KS, Dixon PB, Richey CM, Hood EW 3rd.** Spontaneous clearance of *Chlamydia trachomatis* infection in untreated patients. *Sex Transm Dis* 1997;24:229-235.
- Peipert JF.** Clinical practice. Genital chlamydial infections. *N Engl J Med* 2003;349:2424-2430.
- Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, Armanini D.** Genital tract infections and infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;1403-11.
- Ponsioen CY, Defoer J, Ten Kate FJ, Weverling GJ, Tytgat GN, Pannekoek Y, Wertheim-Dillen PM.** A survey of infectious

agents as risk factors for primary sclerosing cholangitis: are *Chlamydia* species involved? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:641-648.

**Pothier P, Kazmierczak A.** Comparison of cell culture with two different *Chlamydia* tests using immunofluorescence or enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Microbiol* 1986;5:569-572.

**Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A.** Association of *Ureaplasma urealyticum* with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *J Urol* 2000;163:1775-1778.

**Potts JM.** Prospective Identification of national institutes of health category IV prostatitis in men with elevated prostate specific antigen. *J Urol* 2000;164:1550-1553.

**Prozialeck WC, Fay MJ, Lamar PC, Pearson CA, Sagar I, Ramsey KH.** *Chlamydia trachomatis* disrupts N-cadherin dependent cell-cell junctions and sequesters B-catenin in human cervical epithelial cells. *Infect Immun* 2002;70:2605-2613.

**Quinn TC, Gupta PK, Burkman RT, Kappus EW, Barbacci M, Spence MR.** Detection of *Chlamydia trachomatis* cervical infection: a comparison of Papanicolaou and immunofluorescent staining with cell culture. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:394-399.

**Quint KD, van der Helm-van Mil AH, Bergman W, Lavrijsen AP.** Mucocutaneous abnormalities in *Chlamydia trachomatis*-induced reactive arthritis. *Ned Tijdschr Geneesk* 2010;154:1614.

**Radouani F, Bennani A, Takourt B, Hda N, Ibrahimi S, Boutaleb Y, Guinet R, Benslimane A.** *Chlamydia* infections and male infertility in Morocco. *Contracept Fertil Sex* 1996;24:779-783.

**Ramos B, Gallegos G.** Non specific genital infections diagnosed by fresh cytological analysis. *International Congress of Andrology* 2001; 23:299.

**Ramos-Gonzalez B.** Fragmentación del ADN espermático de hombres infértiles con infección genitourinaria ocasionada por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* Efecto de la terapia antibiótica y antioxidante. Universidad Autónoma de Madrid, 2011.

**Rehewy MSE, Thomas AJ, Hafez ESE, Brown WJ, Moghissi KS, Jaszczak S.** *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma) in seminal plasma and spermatozoa from infertile and fertile volunteers. *Eur J Obstet Gynec Reprod Biol* 1978;8:247-251.

**Rezacova J, Masata J, Pribylova M, Drazdakova M.** *Chlamydia trachomatis* in men

with impaired fertility. *Ceska Gynecol* 1999;64:317-315.

**Rivero N.** Infección por *Chlamydia pneumoniae* y crisis asmática: estudio serológico en el área 10 de la comunidad de Madrid. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 2001.

**RIVM.** Urogenitale *Chlamydia trachomatis* in lymphogranuloma venereum. Posting date: 2008. ([http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/Urogenitale\\_Chlamydia/](http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/Urogenitale_Chlamydia/))

**Roberts RO, Bergstralh EJ, Bass, Sarah BE, Lieber M, Steven J.** Prostatitis as a risk factor for prostate cancer. *Epidemiology* 2004;15:93-99.

**Rodríguez R, Hernández R, Fuster F, Torres A, Prieto P, Alberto J.** Infección genital y esterilidad. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001;19:261-266.

**Rogers SM, Miller WC, Turner CF, Ellen J, Zenilman J, Rothman R, Villarreal MA, Al-Tayyib A, Leone P, Gaydos C, Ganapathi L, Hobbs M, Kanouse D.** Concordance of *Chlamydia trachomatis* infections within sexual partnerships. *Sex Transm Infect* 2008;84:23-28.

**Rogsstad K.** Complications in the female and their management, In: Moss T. International handbook of *Chlamydia* 3rd edn. Alen Press, Halsemere, UK, 2008. pp111-121.

**Rosas Arceo J, Toca Porraz L, Diaz Esponda C, Nava Flores J.** *Chlamydia trachomatis* infection in the cervix uterine. *Ginecol Obstet Mex* 1993;61:326-328.

**Rosas Arceo J, Toca Porraz L, Nava Flores J, Castaneda G.** Identification of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sterility of tubal origin. *Ginecol Obstet Mex* 1991;59:252-254.

**Rose BI, Scott B.** Sperm motility, morphology, hyperactivation, and ionophore-induced acrosome reactions after overnight incubation with mycoplasmas. *Fertil Steril* 1994;61:341-348.

**Rota TR, Nichols RL.** Infection of cell culture by trachoma agent: enhancement by DEAE-dextran. *J Infect Dis* 1971;124:419-421.

**Ruijs GJ, Kauer FM, Jager S, et al.** Is serology of any use when searching for correlations between *Chlamydia trachomatis* infection and male infertility? *Fertil Steril* 1990;53:131-135.

**Sabido M, Hernández G, González V, Valles X, Montoliu A, Figuerola J, Isern V, Vinado B, Figueroa L, Casabona J.** Clinic-based evaluation of a rapid point of care test for detection of *Chlamydia trachomatis* in specimens from sex workers in Escuintla, Guatemala. *J Clin Microbiol* 2009;47:475-476.

**Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D.** Recent

- developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology* 2009;135:2-21.
- Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 2004;10:39-51.
- Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2002;78:1215-1224.
- Samra Z, Soffer Y, Pansky M. Prevalence of genital chlamydia and mycoplasma infection in couples attending a male infertility clinic. *Eur J Epidemiol* 1994;10:69-73.
- Satta A, Stivala A, Garozzo A, Morello A, Perdichizzi A, Vicardi E, Salmeri M, Calogero A. Experimental *Chlamydia trachomatis* infection causes apoptosis in human sperm. *Hum Reprod* 2006;21:134-137.
- Schachter J, Grossman M. Infectious diseases of the fetus and new born infant. 5<sup>th</sup> ed. WB Saunders Company. Philadelphia, USA. 2001. pp769-778.
- Schachter J, Hanna L, Hill EC, Massad S, Sheppard CW, Conte JE, Cohen SN, Meyer KF. Are chlamydial infection the most prevalent venereal disease? *JAMA* 1975;2:1252-1255.
- Schachter J. Biology of *Chlamydia trachomatis*. In: Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiesner PJ. Sexually transmitted Diseases, 2<sup>nd</sup> edition. Mac Graw-Hill. New York, 1990. pp167-180.
- Schachter J. Immunodiagnosis of sexually transmitted diseases. *Yale J Biol Med* 1985;58:443-452.
- Schiefer HG. Microbiology of male urethroadnexitis: diagnostic procedures and criteria for aetiologic classification. *Andrologia* 1998;30:7-13.
- Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Waxholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007;370:890-907.
- Schoenwald E, Schmidt BL, Steinmetz G, Hosmann J, Pohla-Gubo G, Luger A, Gasser G. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection-culture versus serology. *Eur J Epidemiol* 1988;4:75-82.
- Sharara FI, Queenan JT. Elevated serum *Chlamydia trachomatis* IgG antibodies. Association with decreased implantation rates in GIFT. *J Reprod Med* 1999;44:581-586.
- Sheffield JS, Andrews WW, Klebanoff MA, Macpherson C, Carey JC, Ernest JM, Wapner RJ, Trout W, Moawad A, Miodovnik M, Sibai B, Varner MW, Cartis SN, Dombrowsky M, Langer O, O'Sullivan MJ. Spontaneous resolution of asymptomatic *Chlamydia trachomatis* in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2005;105:557-562.
- Simms I. Epydemiology of *Chlamydia trachomatis*. In Moss TR. International Handbook of Chlamydia, Haslemere, UK, 2008. p1-11.
- Smith JS, Bosetti C, Munoz N, et al. *Chlamydia trachomatis* and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case case-control study. *Int J Cancer* 2004;111:431-439.
- Smith JS, Munoz N, Herrero R, et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J InfectDis* 2002;185:324-331.
- Soffer Y, Ron-EI R, Golan A, Herman A, Caspi E, Samra Z. Male genital mycoplasmas and *Chlamydia trachomatis* culture: its relationship with accessory gland function, sperm quality, and autoimmunity. *Fertil Steril* 1990;53:331-336.
- Solis EA, Gatti VN, Bouvet BR, Brufman AS, Provenzal C, Feldman R. Round cells in semen and genital infections. *Arch Esp Urol* 2000;53:101-105.
- Stalheim OH, Proctor SJ, Gallagher JE. Growth and effects of Ureaplasmas (T-mycoplasmas) in bovine oviductal organ cultures. *Infect Immune* 1976;13:915-925.
- Stamm WE, Harrison HR, Alexander ER, Cles LD, Spence MR, Quinn TC. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections by direct immunofluorescence staining of genital secretions. A multicenter trial. *Ann Intern Med* 1984;101:638-641.
- Stamm WE, Tam M, Koester M, Cles L. Detection of *Chlamydia trachomatis* inclusions in McCoy cell cultures with fluorescein-conjugated monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1983;17:666-668.
- Stary A, Genc M, Heller-Vitouch C, Mardh PA. Chlamydial antigen detection in urine samples by immunofluorescence tests. *Infection* 1992;20:101-104.
- Steffens WL. A method for the removal of epoxy resins from tissue in preparation for scanning electron microscopy. *J Microsc* 1978;113:95-99.
- Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital Mycoplasmas. *J Clin Microbiol* 2004;42:1528-1533.
- Stephens RS, Koshiyama K, Lewis E, Cubo A. Heparin binding outer membrane protein of

Chlamydia *Mol Microbiol* 2001;40:691-699.

**Storz J, Kaltenboeck B.** The Chlamydiales. In: Woldehiwet Z, Ristic M. Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals. Pergamon Press. Oxford, UK, 1993. pp27-64.

**Stovall DW, Bailey LE, Talbert LM.** The role of aerobic and anaerobic semen cultures in asymptomatic couples undergoing *in vitro* fertilization: effects on fertilization and pregnancy rates. *Fertil Steril* 1993;59:197-201.

**Su H, Caldwell HD.** Sulfated polysaccharides and synthetic sulfated polymer are potent inhibitors of *Chlamydia trachomatis* infectivity *in vitro* but lack protective efficacy in an *in vivo* murine model of Chlamydial genital tract infection. *Infect Immun* 1998;66:1258-1260.

**Su H, Raymond L, Rockey DD, Fisher E, Hackstadt T, Caldwell D.** A recombinant *Chlamydia trachomatis* outer membrane protein binds to heparin sulfate receptors on epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci* 1996;93:1143-1148.

**Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G.** Mycoplasma Genitalium attaches to human spermatozoa. *Hum Reprod* 2003;18:2103-2109.

**Swain GR, McDons RA, Pfister JR, Gradus S, Sedmak GV, Singh A.** Decision analysis: point-of-care Chlamydia testing vs laboratory methods. *Clin Med Res* 2004;2:29-35.

**Swanson J, Eschenbach DA, Alexander ER, Holmes KK.** Light and electron microscopic study of *Chlamydia trachomatis* infection of the uterine cervix. *J Infect Dis* 1975;131:678-683.

**Swenson CE, O'Leary WM.** Examination of human semen infected with *Ureaplasma urealyticum* by fluorescence microscopy. *Arch Androl* 1980;5:373-377.

**Szczygiel M, Kurpisz M.** Teratozoospermia and its effect on male fertility potential. *Andrologia* 1999;31:63-75.

**Szöke L, Török E, Dósa E, Nagy E, Scultéty S.** The possible role of anaerobic bacteria in chronic prostatitis. *Int J Androl* 1998;21:163-168.

**Talkington DF, Davis JK, Cannup KC, Garret BK, Waites KB, Huster GA, Cassel GH.** The effects of three serotypes of *Ureaplasma urealyticum* on spermatozoal motility and penetration *in vitro*. *Fertil Steril* 1991;55:170-176.

**Tam MR, Stamm WE, Handsfield HH, Stephens R, Kuo CC, Holmes KK, Ditzenberger K, Kreiger M, Nowinski RC.** Culture-independent diagnosis of *Chlamydia trachomatis* using monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1984;310:1146-1150.

**Tang FF, Chang HI, HuangYT, Wang KC.**

Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo. *Chin Med J* 1957;75:429-447.

**Tapia R, Rojas J.** Semiología del análisis del semen. *Colegio Mexicano de Urología*. 2003;18:48:52.

**Taraktchoglou M, Pacey AA, Turnbull JE, Eley A.** Infectivity of *Chlamydia trachomatis* serovar LGV but no E is dependent on host cell heparan sulfate. *Infect Immunol* 2001;69:968-976.

**Taylor-Robinson D.** *Mycoplasma genitalium*-an up-date. *Int J STD & AIDS* 2002;13:145-151.

**Terán S, Wlash C, Irwin KL.** *Chlamydia trachomatis* infection in women: Bad news, good news and next steps in prevention. *J Am Med Womens Assoc* 2001;56:100-104.

**Thomas B, Gilchrist C, Taylor-Robinson D.** Detection of *Chlamydia trachomatis* by direct immunofluorescence improved by centrifugation of specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991;10:659-662.

**Thomas BJ, Evans, Hawkins DA, Taylor-Robinson D.** Sensitivity of detecting *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in smears by use of fluorescein labeled monoclonal antibody: comparison with conventional chlamydial isolation. *J Clin Pathol* 1984;37:812-816.

**Trei JS, Canas LC, Gould PL.** Reproductive tract complications associated with *Chlamydia trachomatis* infection in US Air Force males within 4 years of testing. *Sex Transm Dis* 2008;35:827-833.

**Trojan TH, Lishnak TS, Heiman D.** Epididymitis and orchitis: an overview. *Am Fam Physician* 2009;79:583-587.

**Trum JW, Mol BW, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker OP, Van Der Veen F.** Value of detecting leucocytospermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. *Fertil Steril* 1998;70:315-319.

**Trum JW, Pannekoek Y, Spanjaard L, Bleker OP, Van Der Veen F.** Accurate detection of male subclinical genital tract infection via cervical culture and DNA hybridization assay of the female partner. *Int J Androl* 2000;23:43-45.

**Vaishnavi C, et al.** Epidemiology of typhoid carriers among blood donors and patients with biliary, gastrointestinal and other related diseases. *Microbiol Immunol* 2005;49:107-112.

**van Bergen J, Gotz MH, Richardus JH, Hoebe CJ, Broer J, Coenen AJ.** Prevalence of urogenital *Chlamydia trachomatis* increases significantly with level of urbanization and suggest targeted screening approaches: results from the first national population based study in

- the Netherlands. *Sex Transm Infect* 2005;81:17-23.
- van de Laar MJ, Morre SA. Chlamydia: a major challenge for public health. *Euro Surveill* 2007;12:1-2.
- van den Brule AJ, Munk, Winther JF, Kjaer SK, Jorgensen HO, Meijer CJ, Morre SA. Prevalence and persistence of asymptomatic *Chlamydia trachomatis* infections in urine specimens from Danish male military recruits. *Int J STD AIDS* 2002;13:19-22.
- Van der Merwe FH, Kruger TF, Oehninger SC, Lombard CJ. The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2005;59:86-91.
- Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update* 2001;495-500.
- Van Weel J. Rare sexually transmitted disease hits Europe. *Lancet Infect Dis* 2004;37:416-422.
- Van-Der PB, Williams JA, Smith NJ, Batteiger BE, Cullen AP, Erdman H, Edens T, Davis K, Salim-Hammad H, Chou VW, Searce L, Blutman J, Payne WJ. Evaluation of digene hybrid capture assay with the rapid capture system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoea*. *J Clin Microbiol* 2002;40:3558-3564.
- Veznik Z, Pospisil L, Svecova D, Zaijicova A, Unzeitig V. Chlamydia in the ejaculate: their influence on the quality and morphology of sperm. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:656.
- Vicari E. Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. *Hum Reprod* 1999;14:2025-2030.
- Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM. *Chlamydia trachomatis* infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. *Andrología* 2002a;34:155-161.
- Vigil P, Tapia A, Zacharias S, Riquelme R, Salgado AM, Varleta J. First-trimester pregnancy loss and active *Chlamydia trachomatis* infection: correlation and ultrastructural evidence. *Andrología* 2002b;34:373-378.
- Villanueva-Díaz CA, Flores-Reyes GA, Beltrán-Zúñiga M, Echavarría-Sánchez M, Ortiz-Ibarra FJ, Arredondo-García JL. Bacteriospermia and male infertility: a method for increasing the sensitivity of semen culture. *Int J Fertil Women Med* 1999;44:198-203.
- Villegas H, Piñón M, Shor V, Karchmer S. Electron microscopy of *Chlamydia trachomatis* infection of the male genital tract. *Arch Androl* 1991;27:117-126.
- Villegas-Castrejón H, Villanueva-Díaz CA, Solórzano-Santos F, Karchmer S. Esterilidad conyugal por *Chlamydia trachomatis* estudio ultraestructural. *Perinatol Reprod Hum* 1989;8:70-76.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus unnecessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
- Wang SP, Grayston JT. Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organism in a new microtiter indirect immunofluorescence test. *Am J Ophthalmol* 1970;70:367-374.
- Wang SP, Grayston JT. Classification of trachoma virus strain by protection of mice from toxic death. *J Immunol* 1963;90:849-856.
- Wang SP, Kuo CC, Barnes RC, Stephens RS, Grayston JT. Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1985;152:791-800.
- Wang X, Sharma R, Sikka S, Thomas AJ, Falcon T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;80:531-535.
- Wang Y, Liang C, Wu J, Xu C, Qin S, Gao S. Do *Ureaplasma urealyticum* infections in the genital tract affect semen quality? *Asian J Androl* 2006;8:562-568.
- Washington AE, Johnson RE, And Sanders LL. *Chlamydia trachomatis* infections in the United States. What are they costing us? *JAMA* 1987;257:2070-2072.
- Wasserheit JN. Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis* 1992;19:61-77.
- Watson EJ, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh PA, Stary A, Pederson BS. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. *J Med Microbiol* 2002;51:1021-1031.
- Weidner W, Ludwig M, Miller J. Therapy in male accessory gland infection-what is fact, what is fiction?. *Andrología* 1998;30:87-90.
- Weidner W, Shiefer HG, Garbe C. Acute nongonococcal epididimitis. Aetiological and therapeutic aspects. *Drugs* 1987;34:111-117.
- Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, *Perspect Sex*



*Reprod Health* 2000;36:6-10.

**Westrom LV.** *Chlamydia trachomatis*-clinical significance and strategies of intervention. *Semin Dermatol* 1990;9:117-125.

**Witkin SS, Jeremias J, Grifo JA, Ledger WJ.** Detection of *Chlamydia trachomatis* in semen by the polymerase chain reaction in male members of infertile couples. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1457-1462.

**Witkin SS, Kligman I, Bongiovanni AM.** Relationship between an asymptomatic male genital tract exposure to *Chlamydia trachomatis* and an autoimmune response to spermatozoa. *Hum Reprod* 1995;10:2952-2955.

**Witkin SS.** Immunological aspects of genital chlamydia infections. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;16:865-874.

**Wolff H, Neubert U, Zebhauser M, Bezold G, Korting HC, Meurer M.** *Chlamydia trachomatis* induces an inflammatory responses in the male genital tract and is associated with altered semen quality. *Fertil Steril* 1991;55:1017-1019.

**Wolff H.** Methods for the detection of male genital tract inflammation. *Andrologia* 1998;30:35-39.

**Wolff H.** The Biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1995;63:1143-1157.

**Wolner-Hanssen P, Mardh PA.** *In vitro* tests of the adherence of *Chlamydia trachomatis* to human spermatozoa. *Fertil Steril* 1984;42:102-107.

**Woods GL, Bryan JA.** Detection of *Chlamydia trachomatis* by direct fluorescent antibody staining. Results of the College of American Pathologists proficiency testing program. 1986-1992. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:483-488.

**Woolfitt JM, Watt L.** Chlamydial infection on the genital tract in promiscuous an non-promiscuous women. *Br Vener Dis* 1977;14:13-1418

**World Health Organization (WHO).** Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5<sup>th</sup> ed. WHO Press. Geneva, Switzerland, 2010.

**World Health Organization (WHO).** In: Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections: overview and estimates. Geneva, Switzerland, 2001 pp1-43.

**World Health Organization (WHO).** Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4<sup>th</sup> ed. Cambridge University Press, 1992.

**Xiang Y, Chen Q.** Study on infertility caused by infections of *Chlamydia trachomatis* and ureaplasma urealyticum. *Zhonghua Fu Chan Ke Za*

*Zhi* 1996;31:223-225.

**Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF.** The correlation of *Ureaplasma urealyticum* infection with infertility. *Andrologia* 1997;29:219-226.

**Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ.** Antibiotic therapy and leukocytospermia: a prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 1995;63:142-147.

**Yoshikawa H, Nagata C, Noda K, et al.** Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Japan. *Br J Cancer* 1999;80:621-624.

**Yu P, Zhang L, Dai H, Cha G, Sun Y, Shu M.** Research in the relationship between Chlamydia and ureaplasma and infertility. *Human Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1998;23:67-69.

**Zalata A, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonjans F, Comhaire FH.** White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int J Androl* 1998;21:154-162.

**Zalata A, Hafez T, Van Hoecke MJ, Comhaire F.** Evaluation of beta endorphin and interleukin-6 in seminal plasma of patients with certain andrological diseases. *Hum Reprod* 1995;10:3161-3165.

**Zamboni L.** The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril* 1987;48:711-734.

**Zdrodowska B, Ostaszewska I, Badyda J, Galewska Z.** The effect of *Chlamydia trachomatis* infection of the prostate gland on the concentration of citric acid. *Arch Immunol Ther Exp* 2006;54:69-73.

**Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska I, Darewicz B, Darewicz J, Badyda J, Pucilo K, Bulhak V, Szczurzewski M.** Role of *Chlamydia trachomatis* in epididymitis. Direct and serologic diagnosis. *Med Sci Monit* 2000;6:1113-1118.

**Zheng J, Yu SY, Jia DS, Yao B, Ge YF, Shang XJ, Huang YF.** *Ureaplasma urealyticum* infection in the genital tract reduces seminal quality in infertile men. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2008;14:507-512.

**Znazen A, Frikha-Gargouri O, Berrajah L, Bellalouna S, Hakim H, Gueddana N, Hammami A.** Sexually transmitted infections among female sex workers in Tunisia: high prevalence of *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Infect* 2010;86:500-505.

**Zvulunov A, Medvedovsky E, Biton A, Horowitz S, Vardy D.** Association of *Ureaplasma urealyticum* colonization in male urethra and *Condyloma acuminatum*. *Isr Med Assoc J* 2000;2:580-582.